



UNIVERSIDADE DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

Deteção de *Cryptosporidium*, *Giardia* e *Escherichia coli* em vegetais consumidos
crus e possíveis implicações em saúde pública

INÊS LOPES TAVARES DE PINA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho
Doutora Isabel Maria Soares Pereira da
Fonseca de Sampaio
Doutora Marília Catarina Leal Fazeres
Ferreira

ORIENTADORA

Doutora Isabel Maria Soares Pereira da
Fonseca de Sampaio
CO-ORIENTADOR
Doutor Fernando Manuel d'Almeida
Bernardo

2017
LISBOA



UNIVERSIDADE DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

Deteção de *Cryptosporidium*, *Giardia* e *Escherichia coli* em vegetais consumidos
crus e possíveis implicações em saúde pública

INÊS LOPES TAVARES DE PINA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SEGURANÇA ALIMENTAR

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho
Doutora Isabel Maria Soares Pereira da
Fonseca de Sampaio
Doutora Marília Catarina Leal Fazeres
Ferreira

ORIENTADORA

Doutora Isabel Maria Soares Pereira da
Fonseca de Sampaio

CO-ORIENTADOR

Doutor Fernando Manuel d'Almeida
Bernardo

2017

LISBOA

“A alimentação e a nutrição constituem requisitos básicos para a promoção e a proteção da saúde, possibilitando a afirmação plena do potencial de crescimento e desenvolvimento humano, com qualidade de vida e cidadania.”

(Atributos Consignados na Declaração Universal dos Direitos Humanos)

Agradecimentos

Começo por dirigir os meus sinceros agradecimentos a todos os que, de forma direta ou indireta, contribuíram para que esta dissertação fosse concretizada e findada.

À minha orientadora, Professora Doutora Isabel Pereira da Fonseca por me ter dado a oportunidade de trabalhar este tema e por toda a disponibilidade e ajuda prestadas.

Ao Professor Doutor Fernando Bernardo por estar sempre disponível para todas as minhas dúvidas e por todo o auxílio prestado.

À Professora Doutora Marília Catarina Ferreira, por me ter ajudado a terminar tudo, na última fase do trabalho.

À Dra. Lídia Gomes, por tudo o que me ensinou no Laboratório de Doenças Parasitárias e pelo seu bom humor característico que contagiava todos.

À Dra. Anabela Lança, por tudo o que me ensinou no Laboratório de Microbiologia Alimentar, pela companhia e pela paciência nos meus momentos de desespero.

Ao Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal – CIISA por fornecer todo o material de laboratório necessário.

A todos os professores que me acompanharam neste caminho académico, pelo conhecimento e interesse que me foram transmitindo no ramo da segurança alimentar.

Um agradecimento final à minha família que a meu lado sempre demonstrou apoio incondicional a todos os níveis.

Resumo

A presente dissertação enquadra-se no âmbito do Mestrado em Segurança Alimentar e teve como objetivos a pesquisa de parasitas dos géneros *Cryptosporidium* e *Giardia*, e a deteção e quantificação da bactéria *Escherichia coli* em amostras de salsa (n=20), coentros (n=20), hortelã (n=20) e agrião (n=20), produtos hortícolas destinados ao consumo em cru, provenientes de mercados municipais de Viseu e Lisboa. Este trabalho foi realizado no Laboratório de Doenças Parasitárias e no Laboratório de Microbiologia Alimentar da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa.

Para a deteção de oocistos e quistos de protozoários e de ovos de outros possíveis parasitas nas 80 amostras em estudo, foram usadas técnicas laboratoriais de imunofluorescência direta e de sedimentação natural. Todas as amostras mostraram resultados negativos na análise parasitológica. O método do Número Mais Provável (NMP) foi utilizado para a deteção e quantificação de *Escherichia coli*, tendo-se verificado um número considerável de amostras contaminadas por esta bactéria, especialmente na hortelã (20%) e na salsa (10%) dos mercados de Lisboa.

A partir dos resultados obtidos foram salientados possíveis riscos para a saúde pública, e apontadas medidas de gestão de risco tendo em vista minimizar os seus eventuais impactos.

Palavras-chave: Vegetais crus, contaminação, *Cryptosporidium*, *Giardia*, *Escherichia coli*, mercados municipais, Lisboa, Viseu, Portugal.

Abstract

The present dissertation, which is inserted in the Master of Food Safety, was aimed at identifying *Cryptosporidium* and *Giardia* parasites, as well as at detecting and quantifying *Escherichia coli* in samples of parsley ($n = 20$), coriander ($n = 20$), peppermint ($n = 20$) and watercress ($n = 20$), vegetables intended for raw consumption from the municipal markets of Viseu and Lisbon. This work was carried out in the Laboratory of Parasitic Diseases and in the Laboratory of Food Microbiology at the Faculty of Veterinary Medicine of the University of Lisbon.

For the detection of protozoa oocysts, cyst and eggs of other possible parasites in the 80 samples under study, laboratory techniques of direct immunofluorescence and spontaneous sedimentation were used. Regarding these parasitic stages, all samples were negative. The Most Probable Number (MPN) method was used for the detection and quantification of *Escherichia coli*, being found a considerable number of samples contaminated by this bacteria, especially in the mint, 20% (4/20), and the parsley, 10% (2/20), of Lisbon markets.

Based on the results obtained, possible risks to public health were highlighted, and risk management measures were pointed out in order to minimize their possible impacts.

Keywords:

Raw vegetables, contamination, *Cryptosporidium*, *Giardia*, *Escherichia coli*, municipal markets, Lisbon, Viseu, Portugal.

ÍNDICE

Agradecimentos	i
Resumo	iii
Abstract.....	v
Índice de Figuras.....	x
Índice de Tabelas	xi
Índice de Gráficos	xii
Símbolos e Acrónimos	xiii
I. Introdução.....	1
II. Revisão Bibliográfica	3
1. Principais parasitas encontrados em vegetais.....	3
2. Breve referência aos principais parasitas encontrados em vegetais	3
2.1. Protozoários	3
2.2. Helminthes	7
2.2.1. Nemátodes	7
2.2.2. Platelminthes	9
3. Principais bactérias encontradas em vegetais.....	15
4. Breve referência às principais bactérias encontradas em vegetais	15
4.1. <i>Enterobacteriaceae</i>	15
4.1.1. <i>Escherichia coli</i>	15
4.1.2. <i>Salmonella enterica</i>	16
4.1.3. <i>Shigella sonnei</i>	17
4.1.4. <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	17
4.2. <i>Campylobacteriaceae</i>	18
4.2.1. <i>Campylobacter coli</i>	18
4.3. <i>Listeriaceae</i>	18
4.3.1. <i>Listeria monocytogenes</i>	19
5. Diagnóstico laboratorial das formas parasitárias	19
5.1. Métodos parasitológicos diretos	19

5.2.	Métodos parasitológicos indiretos.....	20
5.2.1.	Métodos de concentração.....	20
5.2.2.	Métodos imunológicos - imunofluorescência direta.....	21
6.	Diagnóstico bacteriológico	22
6.1.	Bactérias indicadoras de contaminação fecal.....	22
6.2.	Determinação do NMP de coliformes totais, termotolerantes e <i>E.coli</i>	23
6.3.	Valores de Referência	25
7.	Importância em saúde pública	26
8.	Controlo de parasitas e bactérias em alimentos tendo em vista a saúde pública.....	28
III. Estudo prático - Detecção de <i>Cryptosporidium</i>, <i>Giardia</i> e <i>Escherichia coli</i> em vegetais consumidos crus e implicações em saúde pública		29
1.	Objetivos	29
2.	Material e métodos.....	29
2.1.	Amostragem e proveniência	29
2.1.1.	Métodos de colheita e métodos de conservação	30
2.1.2.	Processamento das amostras.....	31
2.2.	Métodos de análise.....	31
2.2.1.	Análise Parasitológica	31
2.2.1.1.	Concentração por sedimentação espontânea.....	32
2.2.1.2.	Coloração Ziehl- Neelsen (adaptado de Casemore,1991) .	33
2.2.1.3.	Técnica de imunofluorescência direta para pesquisa de (Kit Crypto/Giardia Cel® da Cellabs©)	34
2.2.2.	Análise Microbiológica.....	35
2.3.	Análise Estatística.....	36
3.	Resultados	36
3.1.	Análises Parasitológicas	36
3.2.	Análise Bacteriológica.....	40

4. Discussão	54
5. Conclusões e Perspetivas Futuras	58
IV. Referências Bibliográficas	60

Índice de Figuras

Figura 1 – A – Trofozoíto de <i>Giardia duodenalis</i> corada pelo tricromo. B - Ciclo de vida de <i>Giardia duodenalis</i>	4
Figura 2 - <i>Cryptosporidium</i> spp. oocistos corados com Ziehl-Neelsen.	5
Figura 3 – Ciclo de vida de <i>Cryptosporidium parvum</i>	6
Figura 4 – A - Macho adulto de <i>Enterobius vermicularis</i> . B - Ciclo de vida de <i>Enterobius vermicularis</i>	8
Figura 5 – A - Ovo embrionado de <i>A. lumbricoides</i> , ampliação de 200x. Uma larva é visível no ovo.; B - Ciclo de vida do <i>Ascaris lumbricoides</i>	9
Figura 6 – A – Cisticerco de <i>Taenia solium</i> numa secção de uma lesão encontrada no lobo frontal direito de um paciente; corado com hematoxilina e eosina, ampliação de 40x; B - Ciclo de vida de <i>Taenia solium</i>	10
Figura 7 - Ciclo de vida de <i>E. granulosus</i>	12
Figura 8 – A - Ovo de <i>Fasciola hepatica</i> , ampliação de 400x; B - Ciclo de vida da <i>Fasciola hepatica</i> (trematódo hepático de ovino).	13
Figura 9 - <i>Escherichia coli</i>	16
Figura 10 - <i>Salmonella enterica</i>	16
Figura 11 - <i>Shigella sonnei</i>	17
Figura 12 - <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	17
Figura 13 – <i>Campylobacter coli</i>	18
Figura 14 - <i>Listeria monocytogenes</i>	19
Figura 15 - Quistos de <i>Giardia duodenalis</i> (a) e oocistos de <i>Cryptosporidium parvum</i> (b) marcados com anticorpos de imunofluorescência.	22
Figura 16 - A – Pesagem da amostra; B – Amostra homogeneizada.	31
Figura 17 – A – Sedimentação pelo Método de Hoffman; B – Sedimento após rejeição do sobrenadante; C - Tubos de ensaio e lâminas identificados. Original	33
Figura 18 – A - Kit Crypto/Giardia Cel®; B - Lâmina para imunofluorescência. Original	34
Figura 19 – Lâmina com coloração Ziehl-Neelsen na objetiva de 1000x utilizando óleo de imersão.	38
Figura 20 - A – Verificação de gás nos tubos de Durham; B – Teste de Indol negativo; C – Teste de Indol positivo.	40

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Índice de NMP e intervalo de confiança de 95% para várias combinações de tubos positivos numa série de diluições de 3 tubos com quantidades de inóculo de 10, 1 e 0,1 g ou ml.	24
Tabela 2 – Identificação e proveniência das amostras	30
Tabela 3 - Prevalência de ovos de parasitas em amostras de salsa submetidas a concentração por sedimentação espontânea (n=20)	36
Tabela 4 - Prevalência de ovos de parasitas em amostras de coentros submetidas a concentração por sedimentação espontânea (n=20)	36
Tabela 5 - Prevalência de ovos de parasitas em amostras de hortelã submetidas a concentração por sedimentação espontânea (n=20)	37
Tabela 6 - Prevalência de ovos de parasitas em amostras de agrião submetidas a concentração por sedimentação espontânea (n=20)	37
Tabela 7 - Prevalência de ovos de parasitas em amostras de salsa submetidas a coloração Ziehl-Neelsen (n=20)	38
Tabela 8 - Prevalência de ovos de parasitas em amostras de coentros submetidas a coloração Ziehl-Neelsen (n=20)	38
Tabela 9 - Prevalência de ovos de parasitas em amostras de hortelã submetidas a coloração Ziehl-Neelsen (n=20)	38
Tabela 10 - Prevalência de ovos de parasitas em amostras de agrião submetidas a coloração Ziehl-Neelsen (n=20)	38
Tabela 11 - Prevalência de ovos de parasitas em amostras de salsa submetidas a Imunofluorescência direta (n=20)	39
Tabela 12 - Prevalência de ovos de parasitas em amostras de coentros submetidos a Imunofluorescência direta (n=20)	39
Tabela 13 - Prevalência de ovos de parasitas em amostras de hortelã submetidas a Imunofluorescência direta (n=20)	39
Tabela 14 - Prevalência de ovos de parasitas em amostras de agrião submetidos a Imunofluorescência direta (n=20)	39
Tabela 15 – NMP de Coliformes Fecais nas amostras de salsa.....	41
Tabela 16 – NMP de <i>Escherichia coli</i> nas amostras de salsa.	41
Tabela 17 – Distribuição das amostras de salsa de acordo com os valores de referência.	42
Tabela 18 – NMP de Coliformes Fecais nas amostras de coentros.....	44
Tabela 19 – NMP de <i>Escherichia coli</i> nas amostras coentros.	44
Tabela 20 - Distribuição das amostras de coentros de acordo com os valores de referência.	45
Tabela 24 – NMP de Coliformes Fecais nas amostras de hortelã.	47
Tabela 25 – NMP de <i>Escherichia coli</i> nas amostras de hortelã.	47
Tabela 26 - Distribuição das amostras de hortelã de acordo com os valores de referência.	48
Tabela 21 – NMP de Coliformes Fecais nas amostras de agriões.	50

Tabela 22 – NMP de <i>Escherichia coli</i> nas amostras de agriões.	50
Tabela 23 - Distribuição das amostras de agrião de acordo com os valores de referência.	51

Índice de Gráficos

Gráfico 1 – NMP de Coliformes Fecais e <i>Escherichia coli</i> nas amostras de salsa.	42
Gráfico 2 - Distribuição das amostras de salsa de acordo com os valores de referência nos mercados de Lisboa.	43
Gráfico 3 - NMP de Coliformes Fecais e <i>Escherichia coli</i> nas amostras de coentros.....	45
Gráfico 4 - Distribuição das amostras de coentros de acordo com os valores de referência nos mercados de Lisboa.	46
Gráfico 7 - NMP de Coliformes Fecais e <i>Escherichia coli</i> nas amostras hortelã.....	48
Gráfico 8 - Distribuição das amostras de hortelã de acordo com os valores de referência nos mercados de Lisboa	49
Gráfico 5 - NMP de Coliformes Fecais e <i>Escherichia coli</i> nas amostras de agrião.....	51
Gráfico 6 - Distribuição das amostras de agrião de acordo com os valores de referência nos mercados de Lisboa.	52

Símbolos e Acrónimos

% - Percentagem

< - Menor

> - Maior

± - Mais ou menos

≤ - Menor ou igual

≥ - Maior ou igual

APHA - American Public Health Association

CBVB - Caldo Bille Verde Brilhante

CDC - Centers for Disease Control and Prevention

CONTROL+ - lâmina de controlo positivo

FAO - Food and Agriculture Organization

g – grama

ISO - International Organization for Standardization

L – Litro

mg - milígrama

mL – mililitros

MLx – Mercado de Lisboa

mm - milímetro

MVi - Mercado de Viseu

NMP – Número Mais Provável

°C – Graus Celsius

OMS - Organização Mundial de Saúde

PBS - Tampão fosfato-salino

RGM - Meio de montagem

RR2 - Reagente Crypto/Giardia Cel

spp. - Espécies

UFC – Unidades Formadoras de Colónias

WHO - World Health Organization

I. Introdução

Na Pré-História o homem alimentava-se apenas de vegetais e pequenos animais. Depois, os hábitos de alimentação foram evoluindo e, já na Idade Média acreditava-se que o consumo de carne garantia o aumento da força física, “o homem que se alimenta de carne engorda e adquire força” (Vilarta, Cerri, Martins, Affonso, Modeneze & Mantovini, 2007). A tomada de consciência dos benefícios que os vegetais representam para a saúde modificou esta situação; assim, hoje em dia o consumo de vegetais e frutos frescos tem aumentado consideravelmente, sendo reconhecido que constituem uma importante fonte de vitaminas, minerais, fibras e antioxidantes. Existem hoje evidências científicas de que o consumo de frutos e vegetais ajuda a prevenir um alargado leque de doenças, pelo que a Organização Mundial da Saúde (OMS) aconselha o consumo de 400 gramas diários.

No entanto, em paralelo com o aumento do consumo, as doenças com origem nos alimentos (DOA), nomeadamente aquelas cujos agentes são transmitidos por frutos e vegetais frescos, têm também aumentado. Muitos destes produtos são consumidos crus ou minimamente processados e, se eventualmente estiverem presentes microrganismos patogénicos, existe uma forte probabilidade de ocorrer doença (Santos, 2009).

Os vegetais de folhas verdes foram identificados como o grupo de alimentos de maior preocupação, numa perspetiva de segurança microbiológica. Inclui-se neste grupo todos os vegetais em que a folha é a destinada ao consumo, tais como a alface (*Lactuca sativa*) (todas as variedades), o espinafre (*Spinacia oleracea*), a couve (*Brassica oleracea*), a chicória (*Cichorium intybus*), o agrião (*Rorippa nasturtium-aquaticum*) e as ervas frescas, como coentros (*Coriandrum sativum*), manjerição (*Ocimum basilicum*), salsa (*Petroselinum crispum*) e hortelã (*Mentha spicata*) (FAO/WHO, 2008).

Pretende-se com este trabalho avaliar até que ponto alguns vegetais frescos adquiridos para consumo em mercados municipais, estão contaminadas por parasitas ou por contaminação fecal.

II. Revisão Bibliográfica

1. Principais parasitas encontrados em vegetais

Segundo a Food and Agriculture Organization (2008,) os principais parasitas encontrados em vegetais são protozoários e helmintes, sendo difícil saber até que ponto estão espalhados a nível global, pois em muitos países não é obrigatório notificar a sua presença às autoridades sanitárias. Encontram-se assim, seres do Reino Protozoa, protozoários sobretudo do género *Giardia* e do género *Cryptosporidium* e, seres do Reino Animal, os Helmintes. No caso dos Helmintes encontram-se principalmente seres do Filo Nematelmintes, da Classe Nematoda e seres do Filo Plathelmintes principalmente das Classes Cestoda e Trematoda.

Enquanto os protozoários são microrganismos eucarióticos geralmente unicelulares e heterotróficos, os helmintes são mais complexos e são constituídos por diversos tecidos e diferentes órgãos.

2. Breve referência aos principais parasitas encontrados em vegetais

2.1. Protozoários

Os protozoários são seres unicelulares complexos, capazes de se reproduzirem, alimentar, locomover e produzir energia, e por isso, por muitos anos, foram considerados "animais unicelulares". Vivem em colónias ou isolados, podem encontrar-se na água doce, salgada, em terras húmidas ou ainda no interior de outros seres que parasitam. São, então, de vida livre, ainda que alguns protozoários sejam parasitas, e causem doenças no homem e noutros animais (Tzipori & Ward, 2002).

Os protozoários podem ser divididos de acordo com o seu modo de locomoção em:

Rizópodes: locomoção por pseudópodes;

Ciliados: locomoção através de cílios;

Flagelados: locomoção através de flagelos;

Esporozoários: não têm sistema de locomoção.

2.1.1. *Giardia*

O género *Giardia* apresenta uma ultra-estrutura semelhante à das células eucarióticas mais primitivas; apresenta dois núcleos idênticos, no entanto as mitocôndrias e os cloroplastos estão ausentes (Figura 1A).

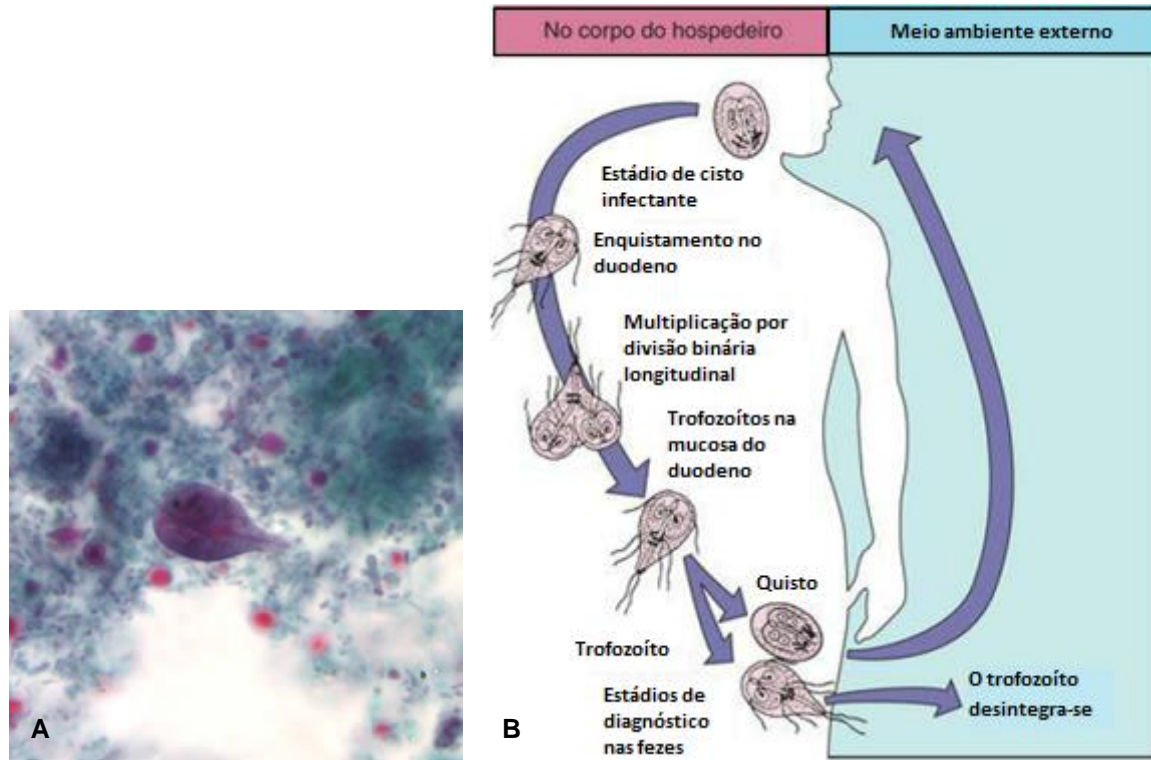


Figura 1 – A – Trofozoíto de *Giardia duodenalis* corada pelo tricromo. B - Ciclo de vida de *Giardia duodenalis*.

A - Fonte: Centers for Disease Control and Prevention (2013) B - Fonte: Adaptado de Murray *et al.* (2009).

Existem diferentes espécies de *Giardia*, que podem infetar vários animais. No homem, o microrganismo vive em condições anaeróbias, no interior do intestino, alimentando-se das secreções entéricas (Murray, Rosenthal & Pfaller, 2009).

Ciclo de vida de *Giardia*

Este microrganismo é um parasita unicelular que, ao longo do seu ciclo de vida (Figura 1B), alterna entre duas formas: quisto e trofozoíto (Adam, 2001).

Os trofozoítos multiplicam-se por bipartição no interior do intestino delgado. Quando os parasitas passam para o intestino grosso, dá-se a formação de quistos (formas resistentes) constituindo formas infetantes que podem contaminar aquíferos. A infeção por *Giardia* (giardíose) pode ocorrer por via hídrica ou alimentação (Ringqvist, 2009).

2.1.2. *Cryptosporidium*

O género *Cryptosporidium* é considerado uma coccídea atípica, na medida em que se diferencia dos restantes parasitas da classe em vários aspetos: apresenta capacidade de autoinfecção; associa-se de forma invulgar à célula do hospedeiro; é relativamente inespecífico de um hospedeiro ou de um órgão; e é resistente aos fármacos antimicrobianos (Tzipori & Ward, 2002).

Cryptosporidium parvum é um protozoário intracelular esférico ou elítico, patogénico para o homem, embora possa também encontrar-se em outros hospedeiros, já que, segundo Rodríguez & Royo (2001), não existe neste protozoário uma completa especificidade para o hospedeiro (Figura 2).

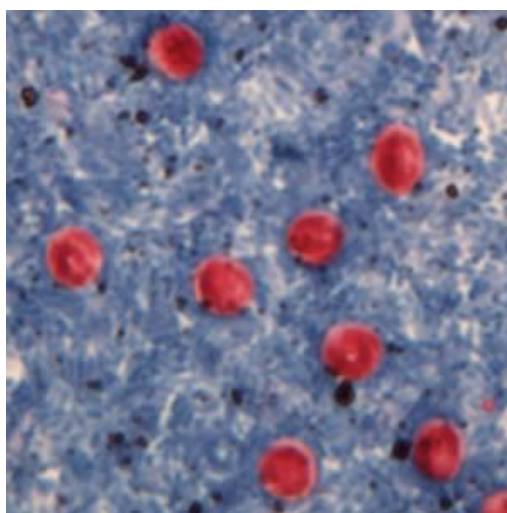


Figura 2 - *Cryptosporidium* spp. oocistos corados com Ziehl-Neelsen.
Fonte: Centers for Disease Control and Prevention (2013)

Ciclo de vida de *Cryptosporidium*

Nas células epiteliais do intestino delgado apresentam um tamanho entre 2 e 6 µm e encontram-se localizados em vacúolos parasitóforos na bordadura e escovas dos enterócitos onde se desenvolvem, culminando na produção de oocistos (Fayer, Morgan & Upton, 2000). Os oocistos maduros tanto se podem romper junto ao trato digestivo do hospedeiro causando a infeção de outras células, como podem ser eliminados para o meio ambiente através das fezes (Murray *et al.*, 2009). Assim, quando ingerido pelo hospedeiro (Figura 3), o oocisto abre-se libertando os quatro esporozoítos que vão invadir, no caso de *Cryptosporidium parvum*, as microvilosidades da metade inferior do intestino delgado, ou seja, jejuno e íleon. Aí invaginam-se em forma de “dedo de luva” sendo englobados por uma membrana da célula hospedeira, que encapsula o parasita no interior do vacúolo parasitóforo. Nestes vacúolos os criptosporídios passam pelas fases de esquizogonia,

gametogonia, fertilização e esporogonia. Alguns oocistos passam por excitação interna com libertação interna de esporozoítos, proporcionando assim o mecanismo para autoinfecção endógena que ocorre em alguns casos de doença crónica, em animais imuno-competentes, e hiperinfecção letal em animais imuno-deficientes (Bowman, Lynn & Georgi 2003).

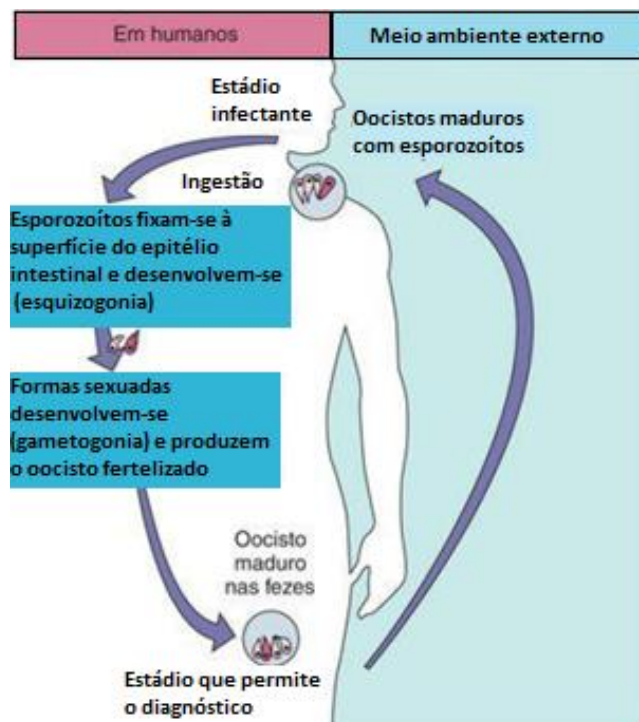


Figura 3 – Ciclo de vida de *Cryptosporidium parvum*.
Fonte: Adaptado de Murray *et al* (2009).

Os criptosporídios são resistentes aos procedimentos usuais de purificação da água (cloração e ozono), e acredita-se que o escoamento do lixo local e da água superficial para os reservatórios municipais seja uma fonte de contaminação importante. A disseminação zoonótica a partir de reservatórios animais para o homem, como a transmissão de pessoa a pessoa através das vias fecal-oral e oral-anal, também são meios comuns de infecção. Profissionais veterinários, tratadores de animais e homossexuais estão particularmente expostos ao risco de infecção. Muitos surtos da infecção são descritos em creches, onde a transmissão fecal-oral é comum (Murray *et al.* 2009). É considerada, em conjunto com *Giardia* spp., um dos principais agentes de Waterborne diseases. Este aspecto é primordial, não só porque as pessoas se infectam pela ingestão da água contaminada ou então pela contaminação dos vegetais frescos com a água de rega.

2.2. Helmintes

São animais invertebrados de corpo mole e comprido, com simetria bilateral, sem extremidades ou apêndices articulados.

Existem vários tipos de helmintes, classificados em dois grandes grupos de acordo com as suas principais características morfológicas: os nemátodes e os platelmintes. No caso dos Helminthes encontram-se principalmente seres do Filo Nematelmintes, da Classe Nematoda e seres do Filo Plathelminthes principalmente da Classe Cestoda e da Classe Trematoda (Murray *et al.* 2009).

2.2.1. Nemátodes

Os helmintes pertencentes ao grupo dos nemátodes têm um corpo comprido, fino e cilíndrico de dimensões variáveis, que podem atingir os 50 cm ou mais (1,20m) de comprimento. Para além disso, apresentam, dimorfismo sexual, existindo exemplares do sexo masculino e outros do sexo feminino, os quais são geralmente de maiores dimensões (Murray *et al.*, 2009).

Os nemátodes mais comuns de importância médica são os oxiúros, *Enterobius vermicularis*, e as lombrigas, *Ascaris lumbricoides*.

a) *Enterobius*

Segundo Murray *et al.* (2009), *Enterobius vermicularis*, oxiúro ou verme em forma de alfinete (do inglês *pinworm*), (Figura 4A) é um verme pequeno e esbranquiçado, presente, tal como os ovos, nas dobras de pele perianais, na pele perineal ou nos lábios vulvares de uma criança infetada.

Ciclo de vida de *Enterobius*

A infeção inicia-se através da ingestão de ovos embrionados (Figura 4B).

As larvas eclodem no intestino delgado e migram para o intestino grosso, onde sofrem maturação para adultos em 2 a 6 semanas. Após a fecundação a fêmea produz ovos assimétricos característicos, os quais são depositados nas dobras de pele perianais, após migração da fêmea. Normalmente são depositados cerca de 20 mil ovos na pele perianal. Os ovos amadurecem rapidamente e tornam-se infetantes dentro de poucas horas.

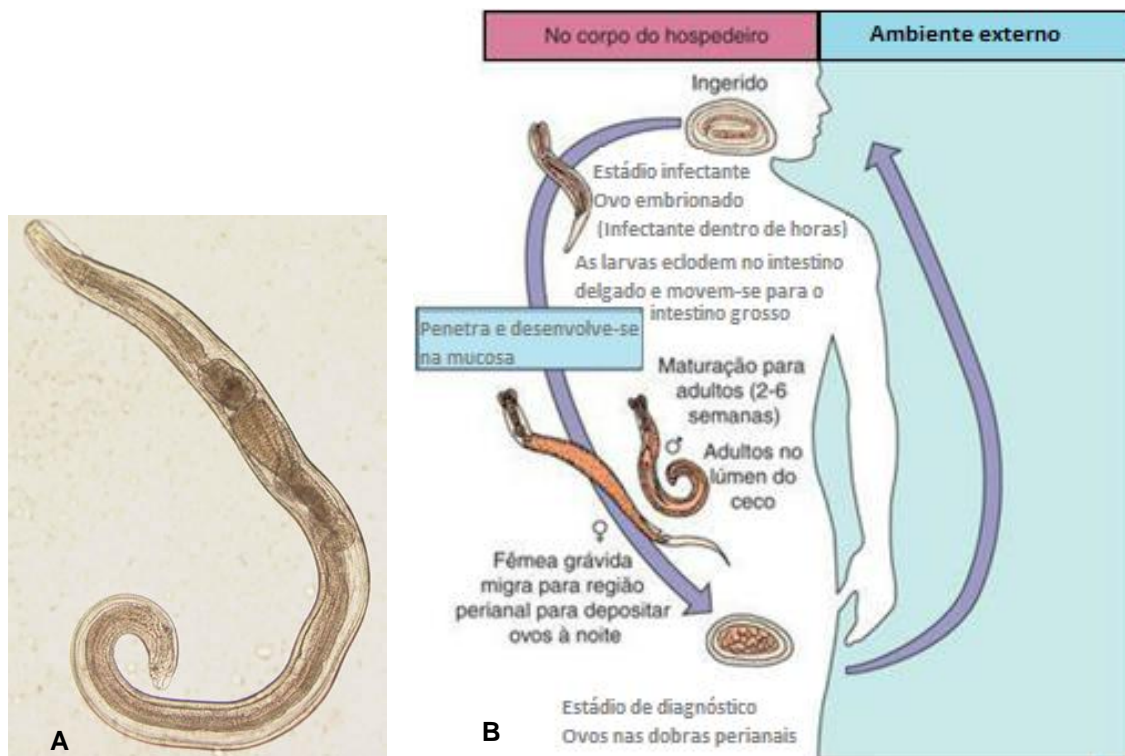


Figura 4 – A - Macho adulto de *Enterobius vermicularis*. B - Ciclo de vida de *Enterobius vermicularis*. A - Fonte: Centers for Disease Control and Prevention (2013) B - Fonte: Adaptado de Murray *et al.* (2009).

b) *Ascaris*

Os membros da espécie *Ascaris lumbricoides* são vermes grandes com 20 a 35 cm de comprimento, rosados, que possuem um ciclo de vida mais complexo do que o de *Enterobius vermicularis*.

Ciclo de vida de *Ascaris lumbricoides*

O ovo infetante (Figura 5A) ingerido liberta uma larva que penetra na parede duodenal (Figura 5B), entra na corrente sanguínea, é transportada até ao fígado e coração e então penetra na circulação pulmonar. A larva invade os alvéolos dos pulmões, cresce e sofre uma muda. Em cerca de 3 semanas, a larva migra pelo sistema respiratório e é expelida com a tosse; sendo deglutida, volta ao intestino delgado.

À medida que os vermes machos e fêmeas sofrem maturação no intestino delgado (principalmente no jejuno), a fecundação da fêmea pelo macho inicia a produção de ovos, que podem atingir até 200 mil ovos por dia, durante até um ano. As fêmeas também podem produzir ovos inférteis na ausência de machos. Os ovos são encontrados nas fezes 60 a 75 dias após a infeção inicial. Os ovos fertilizados

tornam-se infetantes após aproximadamente duas semanas no solo (Murray *et al.* 2009).

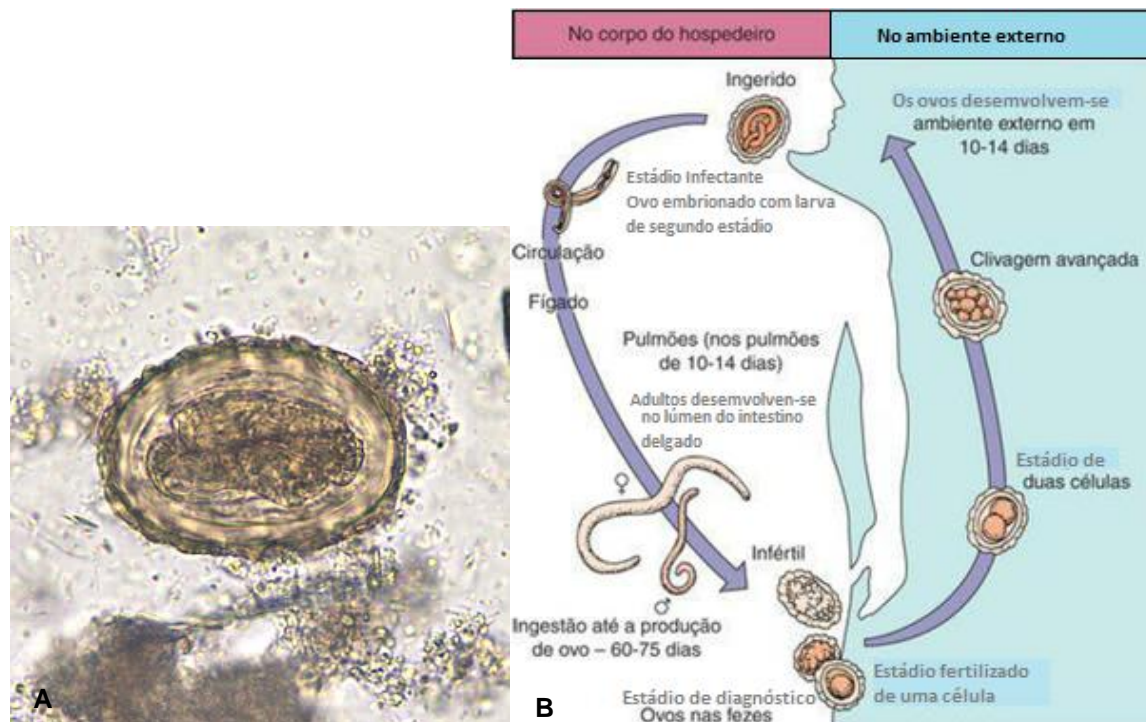


Figura 5 – A - Ovo embrionado de *A. lumbricoides*, ampliação de 200x. Uma larva é visível no ovo.; B - Ciclo de vida do *Ascaris lumbricoides*.

A - Fonte: Centers for Disease Control and Prevention (2013); B - Fonte: Adaptado de Murray *et al.* (2009).

2.2.2. Platelminthes

Os helmintes integrados neste grupo têm, ao contrário dos anteriores, o corpo liso em forma de fita. Entre os platelmintes do ser humano, cujo desenvolvimento se efetua em um ou dois hospedeiros intermediários, é possível distinguir duas classes:

a) Céstodes

Os céstodes possuem um corpo em forma de fita, constituído por um número variável de segmentos. São parasitas que se alimentam por via cuticular, devido ao facto de não terem aparelho digestivo. Estes helmintes são hermafroditas e possuem órgãos de fixação, como ganchos e ventosas. Embora algumas espécies apenas tenham alguns milímetros de comprimento, existem outras, que parasitam o intestino delgado, que podem alcançar até 20 m de comprimento (Murray *et al.*, 2009).

Ciclo de vida dos Céstodes

Segundo Murray *et al.* (2009), a maioria dos céstodes encontrada no intestino delgado humano possui um ciclo de vida complexo, envolvendo hospedeiros intermediários. E, em alguns casos (cisticercose, equinococose), os humanos

servem também como hospedeiros intermediários que albergam os estádios larvares. A presença de larvas extra-intestinais é, algumas vezes, mais grave do que a presença de vermes adultos no intestino.

Os céstodes de importância médica mais comuns são do género *Taenia* e *Echinococcus*.

O estágio larvar, ou cisticerco, das espécies de *Taenia*, é constituído por um escólex, que está invaginado numa vesícula preenchida por fluido. A larva enquistada (Figura 6A) desenvolve-se nos tecidos do hospedeiro intermediário, mede de 4 a 6mm de comprimento e 7 a 11mm de largura, e assemelha-se a uma pérola nos tecidos. Após a ingestão da forma larvar, a fixação do escólex com as suas quatro ventosas musculares e coroa de ganchos, dá início à infecção no intestino delgado (Figura 6B). O parasita produz proglotes (estróbilo ou cadeia de proglotes), podendo atingir vários metros de comprimento. Os proglotes sexualmente maduros contêm ovos e, à medida que deixam o hospedeiro através das fezes, podem contaminar a água e a vegetação ingerida pelo suíno (hospedeiro intermediário). Após a ingestão dos ovos, a oncosfera ou embrião hexacanto (porque possui 6 ganchos) eclode e penetra na parede intestinal do suíno, migrando através da circulação para os tecidos (músculos e cérebro) e tornando-se um cisticerco (Murray *et al.*, 2009).

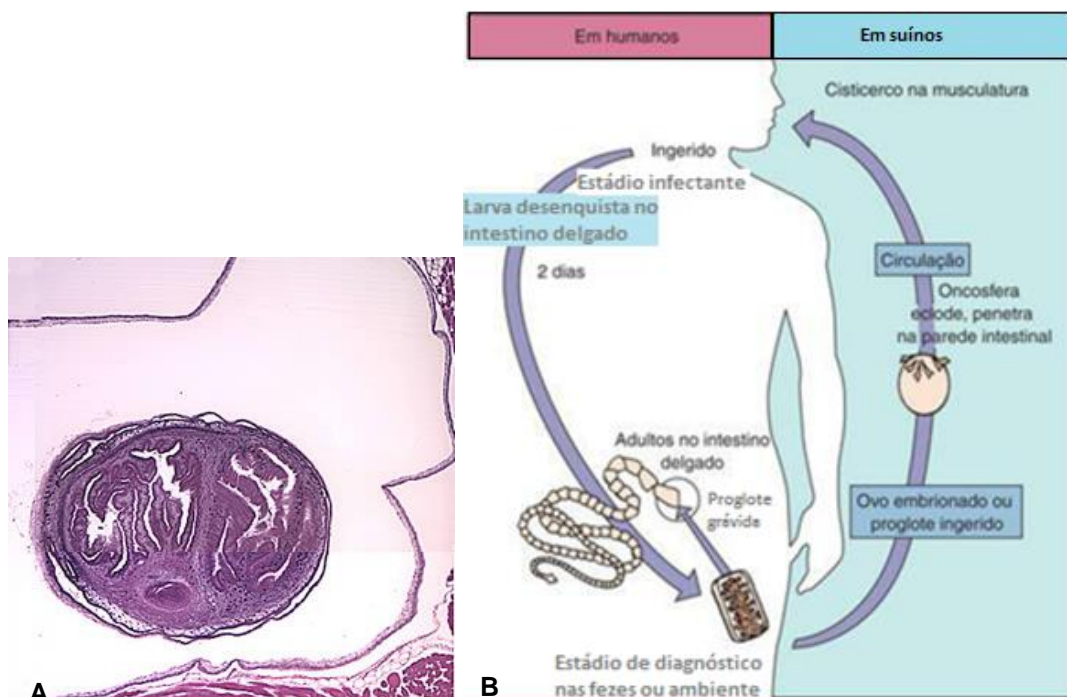


Figura 6 – A – Cisticerco de *Taenia solium* numa secção de uma lesão encontrada no lobo frontal direito de um paciente; corado com hematoxilina e eosina, ampliação de 40x; B - Ciclo de vida de *Taenia solium*
A - Fonte: Centers for Disease Control and Prevention (2013); B - Fonte: Murray *et al.* (2009).

Os céstodes do género *Echinococcus* incluem duas espécies de grande importância em saúde pública: *E. granulosus* que é responsável pela hidatidose quística da espécie humana e dos animais de produção (cavalo, burro, porco, camelo, dromedário, vaca, ovelha, cabra, segundo os sistemas de exploração). A hidatidose afeta também o cão e outros carnívoros selvagens (hospedeiros definitivos); *E. multiloculares* que causa a hidatidose humana alveolar, afeta a raposa (hospedeiro principal) e também o cão, gato, lobo e coio (Bowman *et al.* 2003).

Os adultos de *E. granulosus* vivem no duodeno do cão e medem de 2 a 11 mm de comprimento. Uma vez desenvolvidos, tornam-se hermafroditas e reproduzem-se através do desprendimento do último anel do estróbilo, carregado de ovos, que saem com as fezes para exterior e contaminam os alimentos, a água, etc. Estes parasitas conseguem permanecer no ambiente durante longos períodos de tempo, graças à sua extraordinária resistência às mudanças ambientais.

Os ovos de *E. granulosus* são microscópicos, medem de 30 a 44 µm e não são possíveis de diferenciar dos ovos de outros céstodos. Quando são ingeridos por um hospedeiro intermediário adequado (homem e ruminantes domésticos ou selvagens), os sucos gástricos facilitam a libertação das oncosferas que passam para a circulação geral através de pequenos vasos hemáticos ou linfáticos e chegam a vários órgãos como o fígado e os pulmões, podendo algumas vezes instalarem-se nos rins, baço, músculos e cérebro (Bowman *et al.* 2003).

O tempo necessário para o desenvolvimento de um quisto hidático varia entre alguns meses e vários anos, e o tamanho vai aumentando 1 a 5 cm por ano. A capacidade de resistência é, também muito grande, podendo persistir até 16 anos no cavalo e até cerca de 50 no homem.

Quando um quisto hidático (Figura 7) é ingerido por um cão (alimentado com vísceras provenientes de ruminantes infectados) após 4-6 semanas de infecção, transformam-se em céstodos adultos e voltam a liberar os ovos que vão contaminar o ambiente, fechando-se assim o ciclo de vida destes céstodos (Murray *et al.*, 2009).

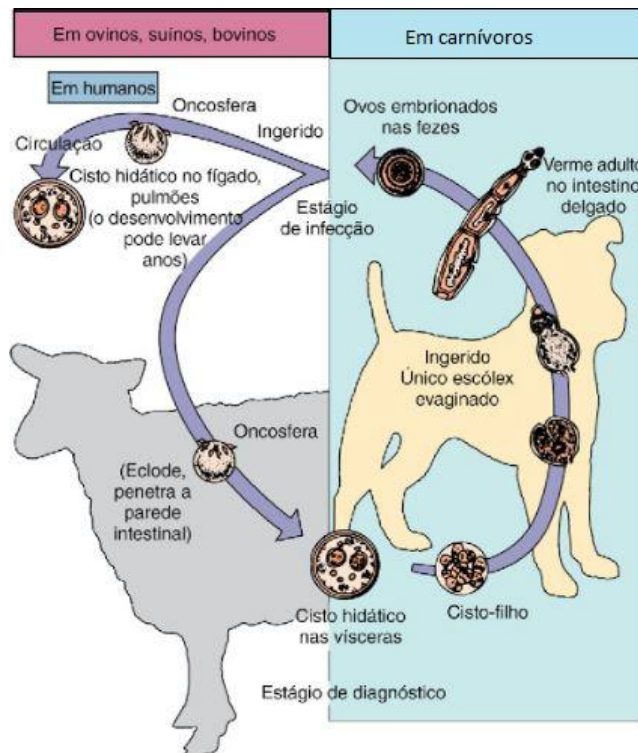


Figura 7 - Ciclo de vida de *E. granulosus*
Fonte: Murray *et al.* (2009).

b) Tremátodes

Os tremátodes são membros do Filo Platyhelminthes invertebrados, com um corpo não segmentado e achatado dorsoventralmente, em forma de folha cobertos com uma cutícula que pode ser lisa ou espinhosa. Em geral, são equipados com duas ventosas musculares: uma oral, que é o início de um sistema digestivo incompleto, e uma ventosa ventral, que é um órgão de fixação. O tegumento é metabolicamente ativo. A maioria dos tremátodes é hermafrodita, com ambos os órgãos reprodutivos femininos e masculinos num único corpo (Bowman *et al.* 2003).

Ciclo de vida dos Tremátodes

Todos os trematódes requerem hospedeiros intermediários para completar os seus ciclos de vida e, sem exceção, os primeiros hospedeiros intermediários são moluscos aquáticos. Nestes hospedeiros, a reprodução é assexuada. Alguns tremátodes necessitam de diversos hospedeiros intermediários antes de alcançar o hospedeiro definitivo (Figura 8B).

Os ovos dos tremátodes têm um opérculo para permitir a saída do miracídeo, o qual busca o hospedeiro molusco apropriado (Figura 8A). Os trematódeos com maior importância médica são as fascíolas.

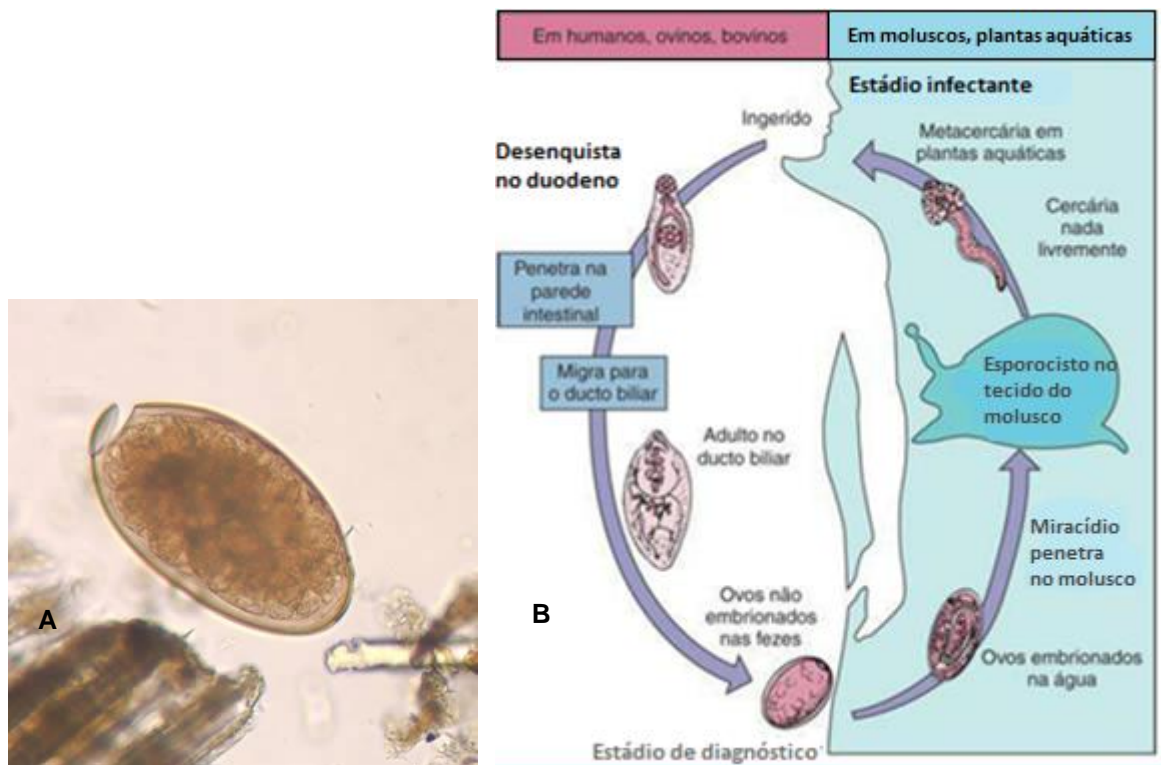


Figura 8 – A - Ovo de *Fasciola hepatica*, ampliação de 400x; B - Ciclo de vida da *Fasciola hepatica* (trematódo hepático de ovino).

A - Fonte: Centers for Disease Control and Prevention (2013); B - Fonte: Murray *et al.* (2009).

3. Principais bactérias encontradas em vegetais

Na Europa, os dados publicados nos relatórios da European Food Safety Authority (EFSA), de 2004 a 2007, referem 50 surtos reportados de Doenças de Origem Alimentar (DOA) causados por agentes bacterianos associados a frutos e vegetais, dos quais resultaram 2862 pessoas doentes, dos quais 56 recorreram a cuidados hospitalares. Os agentes implicados incluíram *Salmonella*, *Campylobacter*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Escherichia coli* e *Shigella sonnei* (Santos, 2009).

Segundo a FAO/WHO (2008) nos vegetais frescos de folha verde como coentros, manjerição ou salsa, existe risco de contaminação bacteriana principalmente por *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Campylobacter*, *Shigella* spp., *Yersinia pseudotuberculosis* e *Listeria monocytogenes*.

4. Breve referência às principais bactérias encontradas em vegetais

4.1. *Enterobacteriaceae*

As bactérias da família *Enterobacteriaceae* são microrganismos Gram-negativos ubíquos, encontrando-se no solo, na água e na vegetação. As bactérias Gram-negativas contêm uma concentração mais elevada de lípidos na parede celular, a qual é mais fina e com maior porosidade, pelo que não retém o corante violeta durante o processo de coloração pelo método de Gram.

Estes microrganismos fazem parte da flora intestinal normal da maioria dos animais, incluindo o homem. No entanto estas bactérias causam também uma variedade de doenças em humanos, incluindo 30% a 35% de todas as bacteriémias, mais de 70% das infeções do trato urinário e muitas infeções intestinais. As infeções do trato gastrointestinal são sobretudo provocadas por *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella* e *Yersinia* (Murray *et al.*, 2009).

As bactérias das espécies *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Shigella sonnei*, *Yersinia pseudotuberculosis* são descritas como as *Enterobacteriaceae* mais frequentes na contaminação de legumes consumidos em cru.

4.1.1. *Escherichia coli*

Escherichia coli (Figura 9) é o mais comum e mais importante membro do género *Escherichia*. Este microrganismo está associado a uma variedade de doenças, incluindo gastroenterite. A maioria das infeções é endógena com a origem a partir da

flora microbiana do paciente, embora as estirpes que causam gastroenterite sejam geralmente adquiridas por via exógena. *E. coli* é um microrganismo anaeróbio facultativo e Gram-negativo, catalase-positivo, oxidase-positivo e pode crescer em temperaturas entre os 8°C e 44-45 °C (International Commission on Microbiological Specifications for Foods, 1996). São bastonetes curtos, extremamente móveis devidos aos seus flagelos (Donnenberg & Kaper, 1992).

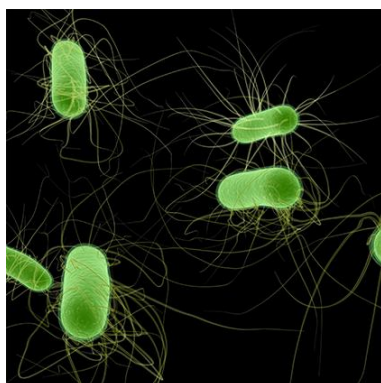


Figura 9 - *Escherichia coli*.
Fonte: Bioquell UK Ltd (2016).

4.1.2. *Salmonella enterica*

Salmonella enterica (Figura 10) é uma bactéria Gram-negativa, móvel, anaeróbia facultativa, não formadora de esporos, em forma de bastonete (Crum-Cianflone, 2008). Atualmente existem mais de 2.500 tipos de *S. enterica* sendo uma causa importante de doenças transmitidas por alimentos nos países em desenvolvimento. Nos países desenvolvidos encontram-se associadas a surtos esporádicos de salmonelose (Andrews-Polymenis, Bäumlér, McCormick & Fang, 2010). A maioria das infecções é adquirida pelo consumo de alimentos contaminados, sendo a carne de aves, os ovos e os laticínios as fontes mais comuns de infecção.

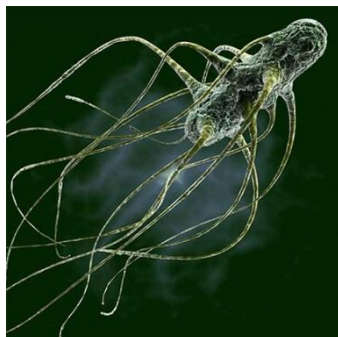


Figura 10 - *Salmonella enterica*.
Fonte: Bioquell UK Ltd (2016).

4.1.3. *Shigella sonnei*

Shigella sonnei é uma bactéria anaeróbia facultativa, imóvel e Gram-negativa (Figura 11). Segundo Niyogi (2005), *Sh. sonnei* distingue-se das outras espécies com base em diferenças bioquímicas e serológicas, pertencendo ao serogrupo D. As espécies deste género são capazes de produzir enterotoxina designada por “toxina Shiga”. Esta toxina tem efeitos neurotóxicos, citotóxicos e enterotóxicos no hospedeiro infetado.

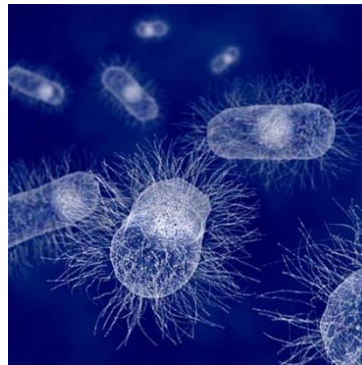


Figura 11 - *Shigella sonnei*.
Fonte: Bioquell UK Ltd (2016).

4.1.4. *Yersinia pseudotuberculosis*

Yersinia pseudotuberculosis é a menos comum das três principais espécies do género *Yersinia* que causam infeções em seres humanos (Figura 12); é um bacilo Gram-negativo, anaeróbio em forma de bastonete que tem sido isolado de apêndices retirados de doentes. A transmissão de *Y. pseudotuberculosis* é fecal-oral através da água e alimentos contaminados, ou por contacto com pessoas ou animais infetados.

Y. pseudotuberculosis tolera muito bem as condições de pH alcalino assim como as temperaturas baixas (<4°C) permanecendo viáveis à temperatura de congelação, -16°C, pelo que sobrevivem em alimentos congelados durante largos períodos de tempo (Chin, 2000).



Figura 12 - *Yersinia pseudotuberculosis*.
Fonte: Study Abroad Microbiology, University of Oklahoma (2016).

4.2. *Campylobacteriaceae*

A família *Campylobacteriaceae* é grande e diversificada compreendendo atualmente o género *Campylobacter* (30 espécies), *Arcobacter* (17 espécies) e *Sulfurospirillum* (7 espécies). Inclui espécies anaeróbias e aeróbias que crescem a temperaturas de 25°C a 42°C; podem ser de vida livre, comensais ou patogénicas; móveis ou aflageladas; e são capazes de colonizar a cavidade oral, o intestino, o estômago, ou o trato reprodutivo de seres humanos (Lastovica, On & Zhang 2014).

4.2.1. *Campylobacter coli*

Campylobacter coli (Figura 13), é uma bactéria Gram-negativa, com uma morfologia curva em forma de S (Conte & Mastromarino, 2015). Muitas estirpes exibem mobilidade, que está associada à presença de um flagelo numa ou em ambas as extremidades (Food and Drug Administration, 2012).

Campylobacter geralmente provoca diarreia, muitas vezes sanguinolenta, febre e cólicas abdominais, e às vezes causa complicações graves, como paralisia temporária (Centers for Disease Control and Prevention, 2013).



Figura 13 – *Campylobacter coli*.
Fonte: Centers for Disease Control and Prevention (2013).

4.3. *Listeriaceae*

As bactérias da família *Listeriaceae* são Gram-positivas, curtas, não originam esporos, são catalase-positivas e anaeróbias facultativas. A parede celular das bactérias Gram-positivas tem menor conteúdo lipídico, sendo estas mais espessas e com menor porosidade, o que diminui a sua permeabilidade. Por isso, retêm o corante violeta no processo de coloração (ICMSF, 1996).

4.3.1. *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes é uma bactéria Gram-positiva, anaeróbia facultativa e patogénica (Figura 14). A doença que provoca, a listeriose, é a terceira principal causa de mortes com origem alimentar, à frente de agentes patogénicos ainda mais comuns, tais como *Salmonella* (Centers for Disease Control and Prevention, 2013).



Figura 14 - *Listeria monocytogenes*.
Fonte: Bioquell UK Ltd (2016).

5. Diagnóstico laboratorial das formas parasitárias

5.1. Métodos parasitológicos diretos

Os métodos diretos têm como objetivo diagnosticar a presença de parasitas, por meio da pesquisa macroscópica ou microscópica das diferentes formas parasitárias. O exame macroscópico permite a verificação da presença de elementos anormais e de vermes adultos ou partes deles na amostra (Neves, Melo, Linardi & Vitor, 2010). O exame microscópico permite a visualização dos ovos ou larvas de helmintes, quistos, trofozoítos ou oocistos de protozoários. A observação microscópica do material a analisar, pode ser direta, entre lâmina e lamela, ou em suspensão em água destilada ou soro fisiológico.

O exame microscópico pode ser quantitativo ou qualitativo. Os métodos quantitativos são aqueles nos quais se faz a contagem dos ovos na amostra, permitindo, assim, avaliar a intensidade do parasitismo. Os métodos qualitativos são os mais utilizados, demonstrando a presença das formas parasitárias, sem, no entanto, as quantificar (Neves *et al.*, 2010).

5.2. Métodos parasitológicos indiretos

Os métodos parasitológicos indiretos permitem o isolamento do parasita para estudos de identificação e caracterização.

Muitas vezes o número de formas parasitárias na amostra é pequeno, havendo necessidade de recorrer a processos de enriquecimento para as concentrar (Neves *et al.*, 2010).

5.2.1. Métodos de concentração

Os métodos de concentração separam quistos de protozoários e ovos de helmintes e, assim, melhoram a detecção de pequenos números de organismos que geralmente não são percebidos quando se faz apenas um esfregaço direto. Após a concentração, o material é corado e examinado microscopicamente (Murray *et al.*, 2009). No caso de *Cryptosporidium*, segundo Neves *et al.* (2010), pode recorrer-se ao emprego de métodos especiais de coloração, como, por exemplo, Ziehl-Neelsen modificado.

Os principais processos de concentração segundo Neves *et al.* (2010), são:

A) Sedimentação espontânea:

Método de Hoffman, Pons e Janer, também conhecido como método de Lutz. Permite a detecção de ovos e larvas de helmintes e de quistos de protozoários. Consiste na filtração de uma suspensão da amostra que ficará posteriormente em repouso para observação microscópica do sedimento. É, portanto, um método geral, permitindo o diagnóstico de vários parasitas.

B) Sedimentação por centrifugação:

Método de Blagg (também conhecido por método de MIFC), método de Ritchie, Coprotest[®]. Usados para a pesquisa de ovos e larvas de helmintes, quistos e alguns oocistos de protozoários (Neves *et al.*, 2010).

O método de concentração difásico de Ritchie modificado, constitui uma das técnicas mais utilizadas na pesquisa de quistos de protozoários e nemátodes. Baseia-se na sedimentação por centrifugação e lavagem do material com éter, um solvente orgânico que forma uma fase apolar, retraindo os artefactos vegetais e lípidos contidos na amostra, durante a centrifugação da suspensão (Rey, 2006).

C) Flutuação espontânea:

Método de Willis. Indicado para a pesquisa de ovos leves, sobretudo de ovos de helmintes, o método de concentração de Willis fundamenta-se na propriedade que determinados ovos têm de flutuarem na superfície de uma solução saturada de cloreto de sódio e ficarem na superfície, aderindo assim a uma lamela colocada sobre a superfície e observada ao microscópio óptico (Neves *et al.*, 2010).

D) Centrífugo-flutuação:

Método de Faust. Usado para a pesquisa de quistos e alguns oocistos de protozoários, permitindo, também, encontrar ovos leves. O Método de Faust é um método de flutuação pelo sulfato de zinco; realiza-se a filtração de uma suspensão da amostra, seguidamente o sedimento resultante é centrifugado e, posteriormente ressuspendido em solução de sulfato de zinco e novamente centrifugado (Oliveira & Germano, 1992). Faz-se a observação microscópica do sedimento.

E) Concentração de larvas de helmintes por migração ativa, devido ao hidrotropismo e termotropismo positivos:

Método de Baermann-Moraes e método de Rugai. Indicados para a pesquisa de larvas de helmintes. Estes métodos são baseados no hidro e termotropismo das larvas que saem do material, migrando para a água quente onde, por gravidade, se depositam no fundo. Em algumas circunstâncias é necessária a visualização dos detalhes no diagnóstico específico, e para isso adicionam-se algumas gotas de lugol à água quente, o que inativa as larvas (Neves *et al.*, 2010).

5.2.2. Métodos imunológicos - imunofluorescência direta

Segundo Rey (2006), os métodos imunológicos diretos e indiretos têm sido muito utilizados, para detetar antigénios, anticorpos ou imunocomplexos relacionados com a existência da infeção parasitária. Esses métodos caracterizam-se pela simplicidade e rapidez de execução, possibilidade de automatização e baixo custo. No método de imunofluorescência direta (IFD) são utilizados para a marcação dos parasitas, anticorpos policlonais ou monoclonais ligados a moléculas corantes fluorescentes (Figura 15). Os corantes fluorescentes absorvem luz e emitem-na num determinado comprimento de onda visível. Podem, por exemplo, ser utilizados

anticorpos monoclonais anti-*Cryptosporidium* marcados com isotiocianato de fluoresceína. Os anticorpos, ligados ou conjugados com o corante, ligar-se-ão aos antígenos dos parasitas, caso sejam encontrados, e assim os locais de reação entre o antígeno e o anticorpo podem facilmente ser visualizados (Medina, Gentil, Caraça, Suzuki & Melles 1996).

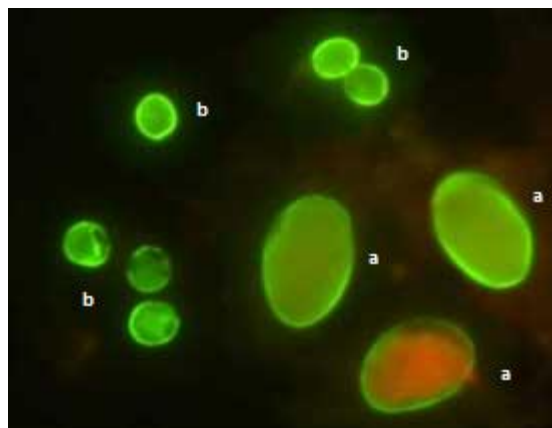


Figura 15 - Quistos de *Giardia duodenalis* (a) e oocistos de *Cryptosporidium parvum* (b) marcados com anticorpos de imunofluorescência.

Fonte: Centers for Disease Control and Prevention, 2013.

6. Diagnóstico bacteriológico

6.1. Bactérias indicadoras de contaminação fecal

Segundo Bastos, Bevilacqua, Nascimento, Carvalho & Silva (2000), para avaliar as condições higiênicas de alguns alimentos utilizam-se por vezes microrganismos indicadores; microrganismos indicadores são grupos ou espécies de microrganismos que, quando presentes num alimento, podem fornecer informações sobre a ocorrência de contaminação de origem fecal, sobre a provável presença de agentes patogênicos ou sobre a deterioração potencial do alimento, além de poderem indicar condições sanitárias inadequadas durante o processamento, produção ou armazenamento do alimento.

Os microrganismos indicadores mais utilizados nas análises de rotina pertencem a vários grupos, de entre os quais, Coliformes totais, Coliformes Fecais (termotolerantes), *Escherichia coli*, Enterococos fecais, esporos de Clostrídios sulfitorreduzidores e bacteriófagos (World Health Organization, 2008).

Os coliformes são organismos em forma de bastonetes Gram-negativos, que possuem, como habitat natural, o trato intestinal do homem e dos animais. Pertencem à família *Enterobacteriaceae*, incluindo muitos géneros, dos quais

destacamos *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Proteus*, *Providencia* e *Citrobacter*. (Sousa, 2006).

Consideram-se dois grupos de bactérias (Bastos *et al.*, 2000)

- a) Coliformes (Totais): grupo de bactérias, em forma de bacilos, Gram-negativas, não-esporuladas, aeróbias ou anaeróbias facultativas, oxidase-negativas, que fermentam a lactose com produção de ácido, gás e aldeído quando incubadas a 35-37°C durante 24-48 horas
- b) Coliformes fecais ou termo-tolerantes: bactérias do grupo coliforme que fermentam a lactose com produção de ácido e gás quando incubadas a 44-45°C durante 24 horas

Os mesmos autores referem que esta distinção tem significado apenas prático-laboratorial já que surgiu de tentativas de diferenciar *Escherichia coli* de outras bactérias da família *Enterobacteraceae* e, dentre estas, aquelas mais nitidamente associadas à contaminação de origem fecal.

Escherichia coli é o microrganismo de escolha como indicador de contaminação fecal, uma vez que é de fácil isolamento nos meios de cultura convencionais (Sousa, 2006).

6.2. Determinação do NMP de coliformes totais, termotolerantes e *E.coli*

O método do Número Mais Provável (NMP) também designado por método dos tubos múltiplos, é bastante utilizado pelos laboratórios de microbiologia de alimentos para estimar a contagem de alguns tipos de microrganismos, permitindo, segundo Abelho (2011), enumerar coliformes totais, coliformes fecais e *Escherichia coli*.

O NMP é uma estimativa de respostas onde os resultados são positivos ou negativos numa ou mais diluições decimais da amostra. Por exemplo, três tubos de meio para cada uma de três diluições são inoculados e incubados, observando-se posteriormente a produção de gás em cada tubo. O NMP não fornece uma medida direta da contagem bacteriana; o número de microrganismos na amostra original é determinado pelo uso de tabelas de estatística, Tabela de McGrady, como a da USDA (United States Department of Agriculture - Food Safety and Inspection Service), que se mostra na Tabela 1.

Tabela 1 - Índice de NMP e intervalo de confiança de 95% para várias combinações de tubos positivos numa série de diluições de 3 tubos com quantidades de inóculo de 10, 1 e 0,1 g ou ml.

Combinação de Positivos	NMP Index por g (ml)	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
0-0-0	<3.0	---	9.5
0-0-1	3.0	0.15	9.6
0-1-0	3.0	1.2	11.
0-1-1	6.1	1.2	18.
0-2-0	6.2	1.2	18.
0-3-0	9.4	2.2	38.
1-0-0	3.6	0.17	18.
1-0-1	7.2	1.3	18.
1-0-2	11.	3.6	38.
1-1-0	7.2	1.3	20.
1-1-1	11.	3.6	38.
1-2-0	11.	3.6	42.
1-2-1	15.	4.5	42.
1-3-0	16.	4.5	42.
2-0-0	9.2	1.4	38.
2-0-1	14.	3.6	42.
2-0-2	20.	4.5	42.
2-1-0	15.	3.7	42.
2-1-1	20.	4.5	42.
2-1-2	27.	8.7	94.
2-2-0	21.	4.5	42.
2-2-1	28.	8.7	94.
2-2-2	35.	8.7	94.
2-3-0	29.	8.7	94.
2-3-1	36.	8.7	94.
3-0-0	23.	4.6	94.
3-0-1	38.	8.7	110.
3-0-2	64.	17.	180.
3-1-0	43.	9.0	180.
3-1-1	75.	17.	200.
3-1-2	120.	37.	420.
3-1-3	160.	40.	420.
3-2-0	93.	18.	420.
3-2-1	150.	37.	420.
3-2-2	210.	40.	430.
3-2-3	290.	90.	1000.
3-3-0	240.	42.	1000.
3-3-1	460.	90.	2000.
3-3-2	1100.	180.	4100.
3-3-3	>1100.	420.	-

Fonte: Laboratory Quality Assurance Division (LQAD), Food Safety and Inspection Service (2008).

O NMP permite enumerar os coliformes totais e os coliformes fecais, mas não diretamente *Escherichia coli* para o que são necessárias três fases: teste presuntivo, teste confirmativo e teste final. Um teste adicional permite determinar a presença ou ausência de *Escherichia coli* na amostra (Abelho, 2011).

a) Teste presuntivo

No teste presuntivo (verificação da produção de gás) inoculam-se volumes apropriados da amostra em séries de tubos contendo Caldo de Bile Verde Brilhante (CBVB), e incubam-se a $37 \pm 0,5^\circ \text{C}$, durante 24 ± 2 horas. Se findo esse período não

tiver havido formação de gás em nenhum tubo, prolonga-se a incubação até às 48 ± 3 horas. O meio de cultura inibe o crescimento dos microrganismos Gram-positivos e estimula o crescimento dos microrganismos coliformes. Os coliformes usam a lactose presente no meio e através da fermentação produzem ácido e gás sob condições anaeróbias. Se não existir produção de gás o resultado do teste é negativo, estabelecendo-se que não existem coliformes na amostra. A formação de gás (resultado positivo) determina a presença de coliformes na amostra. O número de tubos positivos em cada diluição é utilizado para calcular o NMP de microrganismos coliformes na amostra.

b) Teste confirmativo (confirmação dos resultados)

Todos os tubos positivos às 24 horas são repicados para um meio apropriado, incubados a 37°C e lidos nas condições anteriormente descritas. A formação de gás confirma a presença de coliformes na amostra. Este teste confirma os resultados uma vez que a formação de gás no teste presuntivo pode ter sido devida à atividade de microrganismos não coliformes, como por exemplo *Clostridium perfringens*, uma bactéria Gram-positiva.

c) Teste final (verificação da presença de coliformes fecais)

Repete-se o procedimento utilizado no teste confirmativo, mas a incubação é feita a $44,5^{\circ}\text{C}$ durante 24 a 48 horas. A formação de gás determina a presença de coliformes fecais na amostra. Se não existir formação de gás a $44,5^{\circ}\text{C}$, mas existir a 37°C determina-se que existem coliformes mas que não são fecais. O NMP de coliformes fecais é determinado com base no número de tubos positivos em cada diluição.

d) Teste de deteção de *E. coli*

Adiciona-se aos tubos inoculados para o teste final reagente de Kovacs (teste do indol). Uma reação positiva (formação de um anel cor-de-rosa) mostra a presença de *E. coli*. Uma reação negativa (formação de um anel da cor do meio) mostra que *E. coli* não faz parte da população de coliformes fecais presentes na amostra.

6.3. Valores de Referência

Segundo o Regulamento N.º 1441/2007 relativamente a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios, as amostras de produtos hortícolas não

pasteurizados (prontos para consumo), relativamente à *Escherichia coli* podem-se classificar em:

- Satisfatórias, se todos os valores observados forem ≤ 100 unidades formadoras de colónias (UFC)/g;
- Aceitáveis, se houver um máximo de c/n valores entre 100 UFC/g e 1000 UFC/g, e os restantes valores observados forem ≤ 100 UFC/g, sendo n = número de unidades que constituem a amostra; c = número de unidades da amostra com valores entre 100 UFC/g e 1000 UFC/g.
- Insatisfatórias, se um ou mais valores observados forem > 1000 UFC/g ou mais do que c/n valores estiverem entre 100 UFC/g e 1000 UFC/g.

7. Importância em saúde pública

Os parasitas afetam a saúde de milhões de pessoas anualmente, infectando tecidos e órgãos e causando diarreia, emagrecimento, anemia, epilepsia, choques anafiláticos, entre outras situações patológicas. Alguns parasitas podem viver no organismo humano durante décadas. Um protozoário em particular, *Cryptosporidium parvum*, que já foi encontrado em mais de 170 espécies animais que disseminam oocistos para o ambiente (água e solos), pode contaminar os vegetais, os quais, se consumidos crus, podem constituir fonte de infeção para o Homem.

A ocorrência de parasitoses é favorecida pelas condições precárias de saneamento, pelo que nos países desenvolvidos a probabilidade de contaminação é menor; no entanto, mesmo assim os vegetais de folhas verdes têm sido associados a vários focos de doença de origem alimentar com elevada morbidade, em pelo menos, três regiões do mundo. Constatou-se a existência de pelo menos 30 focos ligados a estes produtos nos EUA e 5 na Suécia ao longo dos últimos 10 anos. Embora os relatos de surtos sejam provenientes de países desenvolvidos da Europa, América do Norte e do Sudoeste do Pacífico, isso pode ser um reflexo de sistemas de vigilância de doença implementados nessas regiões (FAO/WHO 2008).

Segundo Dacach (1984), o saneamento, uma das armas da Saúde Pública, engloba um conjunto de medidas que visa preservar ou modificar as condições do ambiente com a finalidade de prevenir doenças e promover a saúde. O saneamento básico restringe-se ao abastecimento de água e disposição de esgotos, e ainda ao tratamento do lixo. Outras atividades de saneamento abrangem o controlo de

animais e insetos, escolas, locais de trabalho e de lazer e habitações, além de alimentos.

A bactéria *Escherichia coli* presente nos vegetais é geralmente apontada como sendo útil para permitir sinalizar contaminações fecais humanas e animais; serve para estimar as características higiênicas dos vegetais crus ou a falta de cuidados de higiene na manipulação destes alimentos no decurso do processamento. A bactéria *Escherichia coli* apresenta uma grande diversidade de adaptações ao meio, podendo, alguns tipos fisiopatogénicos, causar diarreias nos humanos e nos animais (Almeida, 2010).

Segundo Sousa (2006), as doenças causadas por contaminantes biológicos presentes na água e/ou nos alimentos constituem-se como problemas de saúde pública. A transmissão dessas doenças pode ocorrer de forma direta através da ingestão da água ou dos alimentos ou indireta, na preparação de alimentos, na higiene pessoal, agricultura e no lazer. Os principais microrganismos presentes na água e em alimentos contaminados e responsáveis pelas numerosas doenças são *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, entre outros. Assim, os maiores riscos para a saúde estão associados ao consumo de água e/ou de alimentos contaminados por agentes patogénicos.

Um surto recente associado a *Salmonella* no manjericão fresco cultivado em Israel, foi origem de doenças em, pelo menos 4 países e foi reportada uma morte. Portanto, não foi descartada a possibilidade de doença ligada a esse produto noutras partes do mundo. A gravidade da doença é muitas vezes associada aos perigos implicados, e a gama de riscos que têm sido associados a este grupo de produtos é extensa. Por exemplo, *Escherichia coli* enterohemorrágica nestes produtos tem causado doença grave e até mortes (FAO/WHO 2008).

8. Controlo de parasitas e bactérias em alimentos tendo em vista a saúde pública

Existem várias oportunidades para controlar a contaminação por parasitas e bactérias na produção de vegetais de folhas verdes. No entanto, não há um ponto de controlo único, pois dada a complexidade e as diferenças dos sistemas de produção primária, transformação, embalagem e distribuição, há medidas que precisam de ser tomadas em todas as etapas para controlar os riscos de contaminação.

O tipo de produção de vegetais de folhas verdes varia amplamente, quer dentro dos países como entre os países, indo desde grandes produtores industriais a pequenos agricultores. Os vegetais de folhas verdes podem ser comercializados e consumidos localmente, mas também a nível nacional ou internacional. Por outro lado, enquanto a produção primária é provavelmente a principal preocupação em termos de introdução do perigo, há ainda diversas etapas pós-colheita que podem proporcionar a oportunidade para os agentes patogénicos contaminarem os vegetais, nomeadamente durante o transporte (por exemplo, aberto, o transporte desprotegido, etc.), processamento (mistura de diferentes tipos de folhas verdes), embalagem (contaminação por manipuladores), distribuição e retalho.

Existem também oportunidades de contaminação cruzada de produtos durante o processamento, em particular no caso de pré-corte e empacotamento, até porque existem também diferenças na forma como os diferentes vegetais são tratados, por exemplo, ervas de folhas delicadas podem ser sujeitas a menos lavagens. Outras diferenças incluem a aplicação da cadeia de frio, que varia claramente de país para país.

As várias etapas por que passam estes alimentos desde a produção até ao consumidor final, sempre com hipótese de contaminação cruzada, dificultam o controlo de risco (FAO/WHO 2008).

III. Estudo prático - Detecção de *Cryptosporidium*, *Giardia* e *Escherichia coli* em vegetais consumidos crus e implicações em saúde pública

1. Objetivos

O presente estudo tem os seguintes objetivos:

- ✓ Avaliar alguns parâmetros de qualidade bacteriológica e parasitológica de amostras de produtos hortícolas destinados ao consumo em cru, nomeadamente a salsa, os coentros, a hortalã e o agrião, comercializados em Mercados Municipais de Lisboa e Viseu;
 - Pesquisar parasitas dos géneros *Cryptosporidium* e *Giardia*;
 - Detetar e quantificar coliformes fecais e a bactéria *Escherichia coli* nas amostras;
- ✓ Enumerar possíveis riscos para a saúde humana a partir dos resultados obtidos;
- ✓ Apontar medidas de gestão de risco tendo em vista minimizar os seus eventuais impactos.

2. Material e métodos

2.1. Amostragem e proveniência

A obtenção das amostras foi realizada nos mercados municipais de Lisboa e Viseu durante os meses de outubro de 2015 a fevereiro de 2016, com periodicidade semanal.

Foram adquiridas 20 amostras de cada um dos legumes em estudo, salsa, coentros, hortalã e agrião, perfazendo um total de 80 amostras.

Todas as amostras foram adquiridas em mercados municipais, predominantemente no distrito de Lisboa, onde foram adquiridas 17 amostras de cada legume, em 9 mercados diferentes (MLx1 a MLx9). Foram ainda adquiridas 3 amostras de cada legume no distrito de Viseu (MVi1) (Tabela 2).

Tabela 2 – Identificação e proveniência das amostras

Nº da amostra	Data da aquisição	Proveniência
1	02/10/2015	MLx1
2	05/10/2015	MLx 2
3	12/10/2015	MLx 3
4	19/10/2015	MLx 4
5	02/11/2015	MLx 1
6	09/11/2015	MLx 5
7	16/11/2015	MLx 6
8	23/11/2015	MVi1
9	03/12/2015	MLx 7
10	14/12/2015	MLx 2
11	05/01/2016	MLx 8
12	12/01/2016	MVi1
13	18/01/2016	MLx 9
14	26/01/2016	MVi1
15	02/02/2016	MLx 1
16	02/02/2016	MLx 1
17	17/02/2016	MLx 1
18	17/02/2016	MLx 1
19	22/02/2016	MLx 1
20	22/02/2016	MLx 1

Os diferentes mercados municipais possuíam condições semelhantes de armazenamento e comercialização dos legumes, diferindo somente quanto a algumas características das instalações físicas. No geral, as condições de higiene dos mercados eram satisfatórias, no entanto o armazenamento dos legumes era feito em caixas expostas à temperatura ambiente, verificando-se em alguns mercados que estavam empilhadas umas sobre as outras.

2.1.1. Métodos de colheita e métodos de conservação

Para cada colheita era adquirido um molho de salsa, um molho de coentros, um molho de agrião e um molho de hortelã.

Aquando da aquisição as amostras eram manipuladas e embaladas pelo vendedor, em condições normais de comercialização.

Todas as amostras eram depois acondicionadas, individualmente, em sacos estéreis, identificadas e transportadas à temperatura ambiente no próprio dia até aos laboratórios de Parasitologia e de Microbiologia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa (FMVULisboa)

2.1.2. Processamento das amostras

a) Processamentos das amostras para a pesquisa de parasitas

À chegada ao Laboratório de Doenças Parasitárias eram retirados aleatoriamente de cada dos quatro sacos alguns pés de vegetais. Estes pés eram divididos à mão em pedaços pequenos e colocados em copos de precipitação com capacidade de 500ml, aos quais se adicionam água e umas gotas de detergente da loiça para reduzir a tensão superficial, agitando com a ajuda de uma vareta. A mistura ficava reservada durante 24h na hotte, à temperatura ambiente.

b) Processamentos das amostras para pesquisa de *E. coli*

À chegada ao Laboratório de Microbiologia Alimentar eram retirados aleatoriamente de cada um dos quatro sacos alguns pés de vegetais que se colocavam em diferentes sacos de homogeneização Stomacher com filtro lateral até perfazer 10g de cada vegetal. A cada saco eram adicionados 90 ml de água peptonada esterilizada, obtendo-se assim a diluição inicial de 1:10. Seguidamente a amostra diluída foi colocada no homogeneizador até total esmagamento (Figura 15).

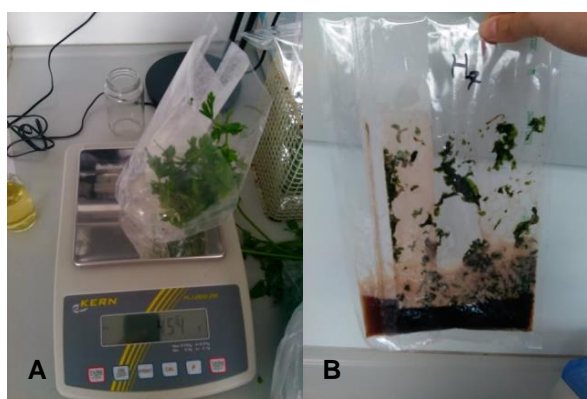


Figura 16 - A – Pesagem da amostra; B – Amostra homogeneizada.
Original

2.2. Métodos de análise

2.2.1. Análise Parasitológica

Para a deteção de protozoários e de outros possíveis parasitas (oocistos, ovos e quistos) foram usadas técnicas laboratoriais de sedimentação espontânea e de imunofluorescência direta. Esta técnica é especialmente indicada para pesquisa de ovos e oocistos.

2.2.1.1. Concentração por sedimentação espontânea

A concentração da amostra foi adaptada para vegetais através do Método de Hoffman (Hoffman et al. 1934), do qual se realizou a filtração das suspensões das 4 amostras, que ficaram posteriormente em repouso para observação microscópica do sedimento.

Procedimento efetuado:

- 1) Filtração de cada uma das 4 suspensões para copos de sedimentação, utilizando gaze para remoção dos detritos maiores, por forma a permitir a migração dos parasitas por ação da gravidade, lavando os detritos retidos nos gobelés através da junção de mais água;
- 2) As gazes contendo o produto filtrado, eram mergulhadas nos filtrados (Figura 17A);
- 3) Sedimentação durante 24 horas;
- 4) Após o tempo de sedimentação, as gazes com as amostras e os respetivos líquidos sobrenadantes foram cuidadosamente descartadas sem levantar ou perder os sedimentos (Figura 17B);
- 5) Recolha, com uma pipeta de Pasteur, de 4 subamostras dos sedimentos com um pouco do líquido sobrenadante para observação microscópica, entre lâmina e lamela (Figura 17C);
- 6) Observação ao Microscópio Ótico Composto (MOC) nas objetivas de 10x, 20x e 40x.

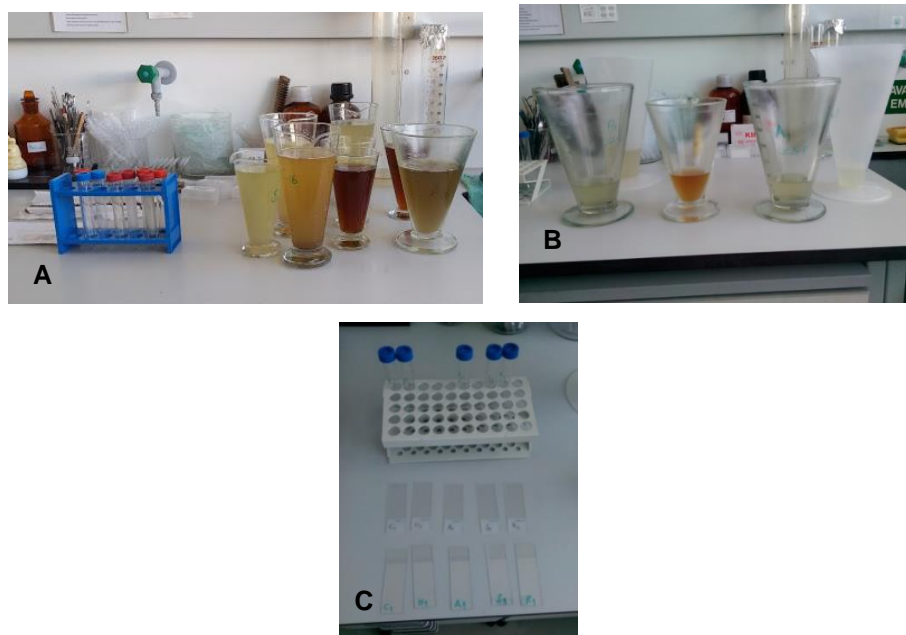


Figura 17 – A – Sedimentação pelo Método de Hoffman; B – Sedimento após rejeição do sobrenadante; C - Tubos de ensaio e lâminas identificados. Original

2.2.1.2. Coloração Ziehl- Neelsen (adaptado de Casemore,1991)

Esta técnica foi efetuada para a pesquisa de occistos de *Cryptosporidium* spp. e de quistos de *Giardia* spp.

- 1) Recolha de 3 a 4 gotas de cada sedimento (com um pouco do respetivo líquido sobrenadante) para uma lâmina devidamente identificada e deixar a secar ao ar;
- 2) Cobrir as preparações com metanol durante 1 minuto;
- 3) Cobrir totalmente as preparações com Fucsina e deixar atuar durante 10 minutos.
- 4) Lavar com água corrente;
- 5) Cobrir com Ácido clorídrico a 1% durante alguns segundos e lavar com água corrente;
- 6) Colocar o corante Verde de Malaquite a 0,4% sobre as preparações e deixar atuar durante 30 segundos. Lavar novamente com água corrente;
- 7) Deixar secar bem num suporte, em posição vertical.
- 8) Observação ao MOC com as objectivas de 40x e 100x utilizando neste ultimo caso, óleo de imersão.

2.2.1.3. Técnica de imunofluorescência direta para pesquisa de (Kit Crypto/Giardia Cel® da Cellabs©)

Procedimento efetuado (Figura 18A e B), de acordo com o protocolo da Cellabs©.

- 1) Proceder à recolha do restante sedimento de cada copo para tubos de ensaio devidamente identificados;
- 2) Centrifugar e destacar o sobrenadante;
- 3) Diluir uma pequena porção de cada amostra nos tubos de ensaio em 1ml de PBS (tampão fosfato-salino) e homogeneizar a mistura;
- 4) Colocar 20µl da solução anterior num poço da lâmina para uso de imunofluorescência e repetir este procedimento para cada amostra, trocando de ponteira entre cada uma, até se completarem todos os poços;
- 5) Deixar a lâmina ao ar até secar completamente; fixar durante cinco minutos em acetona e deixar secar novamente;
- 6) Adicionar 25µl do reagente RR2 (reagente Crypto/Giardia Cel) a cada amostra da lâmina em estudo e à amostra da lâmina CONTROL+ (lâmina de controlo positivo), abrangendo bem toda a área;
- 7) Incubar a lâmina a 37°C em câmara húmida durante 30 minutos; neste passo é importante não deixar secar a lâmina ou poderão ocorrer ligações não específicas;
- 8) Após a saída da estufa, passar a lâmina por uma lavagem com PBS, durante um minuto e remover cuidadosamente a humidade em torno dos poços com papel absorvente;
- 9) Adicionar uma gota de RGM (meio de montagem) a cada poço e cobrir a lâmina com lamela, sem bolhas de ar; observar de imediato a lâminas ao microscópio de fluorescência com comprimento de onda de 450 µm, com ampliação de 400x.



Figura 18 – A - Kit Crypto/Giardia Cel®; B - Lâmina para imunofluorescência. Original

2.2.2. Análise Microbiológica

Foi usado o método do Número Mais Provável para a detecção e quantificação de coliformes fecais e de *Escherichia coli*.

Segundo o protocolo interno do laboratório,

- 1) Utilizar 9 tubos de ensaio previamente preparados, com tubos de Durham no interior, e com 9 ml de CBVB em concentrações diferentes:
 - 6 Tubos com concentração simples de CBVB;
 - 3 Tubos com concentração dupla de CBVB;
- 2) De forma a obter 1g, 0,1g e 0,01g da amostra, pipetar, respectivamente do saco Stomacher contendo a amostra:
 - 10ml do homogeneizado filtrado, para os 3 tubos de concentração dupla de CBVB;
 - 1ml do homogeneizado filtrado, para 3 dos tubos de concentração simples de CBVB;
 - 0,1ml do homogeneizado filtrado para os restantes 3 tubos de concentração simples de CBVB;
- 3) Incubar os 9 tubos relativos a cada amostra a 42° C, durante 48±2 horas;
- 4) Verificar a produção de gás, indicador da presença de coliformes fecais, em cada um dos 9 tubos de Durham.
- 5) Utilizar o número de tubos positivos em cada diluição de cada legume para calcular o NMP de microrganismos coliformes fecais na amostra.

Para a realização do teste de detecção de *Escherichia coli*

- 6) Repicar todos os tubos positivos para tubos contendo água peptonada.
- 7) Incubar os tubos inoculados relativos a cada amostra, a 42° C durante 48±2 horas;
- 8) Adicionar aos tubos após incubação 3 a 4 gotas de reagente de Kovacs (teste do indol).
- 9) Observar a formação de anel cor-de-rosa que revela reação positiva da presença de *Escherichia coli* ou de anel amarelo revelador da reação negativa que mostra a ausência de *Escherichia coli* na população de coliformes fecais presentes na amostra;

- 10) Utilizar o número de tubos positivos em cada diluição de cada legume para calcular o NMP de *Escherichia coli* na amostra.

2.3. Análise Estatística

O programa utilizado para a apresentação dos resultados e análise estatística foi o programa Excel®, Microsoft Office para Windows 8®.

Na parasitologia foi determinada a prevalência de parasitas nas amostras de legumes, através do cálculo da percentagem de amostras positivas em relação ao número total de amostras (n).

Para os métodos parasitológicos foram utilizadas tabelas estatísticas que informam o NMP para as diferentes combinações de tubos positivos e que também incluem os limites de confiança dos números mais prováveis dos microrganismos pesquisados (Tabela 1).

3. Resultados

3.1. Análises Parasitológicas

Concentração por sedimentação espontânea:

As 17 amostras de salsa, coentros, hortelã e agrião (n=68) provenientes dos 9 MLx, tal como as 3 amostras provenientes do MV dos mesmos vegetais (n=12) foram submetidas à concentração por sedimentação espontânea, e observadas ao MOC. Para cada vegetal obtiveram-se as prevalências de ovos de parasitas mostrados nas Tabelas 3, 4, 5 e 6.

Tabela 3 - Prevalência de ovos de parasitas em amostras de salsa submetidas a concentração por sedimentação espontânea (n=20)

Origem	N.º de amostras de salsa	N.º de amostras positivas	Prevalência (%)
MLx	17	0	0
MV	3	0	0

Tabela 4 - Prevalência de ovos de parasitas em amostras de coentros submetidas a concentração por sedimentação espontânea (n=20)

Origem	N.º de amostras de coentros	N.º de amostras positivas	Prevalência (%)
MLx	17	0	0
MV	3	0	0

Tabela 5 - Prevalência de ovos de parasitas em amostras de hortelã submetidas a concentração por sedimentação espontânea (n=20)

Origem	N.º de amostras de hortelã	N.º de amostras positivas	Prevalência (%)
MLx	17	0	0
MV	3	0	0

Tabela 6 - Prevalência de ovos de parasitas em amostras de agrião submetidas a concentração por sedimentação espontânea (n=20)

Origem	N.º de amostras de agrião	N.º de amostras positivas	Prevalência (%)
MLx	17	0	0
MV	3	0	0

Coloração Ziehl- Neelsen

As 17 amostras de salsa, coentros, hortelã e agrião (n=68) provenientes dos 9 mercados de Lisboa (ML), tal como as 3 amostras dos mesmos vegetais (n=12) provenientes do mercado de Viseu (MV) foram submetidas à coloração Ziehl-Neelsen, e observadas ao MOC (Figura 19), obtendo-se os seguintes resultados de prevalência de ovos de parasitas expostos nas Tabelas 7, 8, 9 e 10

Tabela 7 - Prevalência de ovos de parasitas em amostras de salsa submetidas a coloração Ziehl-Neelsen (n=20)

Origem	N.º de amostras de salsa	N.º de amostras positivas	Prevalência (%)
MLx	17	0	0
MV	3	0	0

Tabela 8 - Prevalência de ovos de parasitas em amostras de coentros submetidas a coloração Ziehl-Neelsen (n=20)

Origem	N.º de amostras de coentros	N.º de amostras positivas	Prevalência (%)
MLx	17	0	0
MV	3	0	0

Tabela 9 - Prevalência de ovos de parasitas em amostras de hortelã submetidas a coloração Ziehl-Neelsen (n=20)

Origem	N.º de amostras de hortelã	N.º de amostras positivas	Prevalência (%)
MLx	17	0	0
MV	3	0	0

Tabela 10 - Prevalência de ovos de parasitas em amostras de agrião submetidas a coloração Ziehl-Neelsen (n=20)

Origem	N.º de amostras de agrião	N.º de amostras positivas	Prevalência (%)
MLx	17	0	0
MV	3	0	0

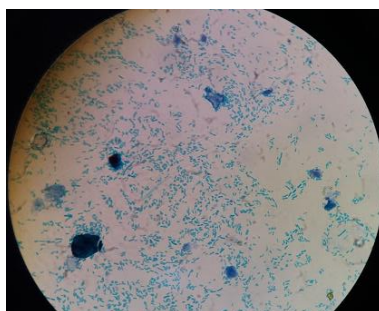


Figura 19 – Lâmina com coloração Ziehl-Neelsen na objetiva de 1000x utilizando óleo de imersão. Original

Técnica de Imunofluorescência Direta

As 17 amostras de salsa, coentros, hortelã e agrião (n=68) provenientes dos 9 mercados de Lisboa (ML), tal como as 3 amostras provenientes do mercado de Viseu (MV) dos mesmos vegetais (n=12) foram submetidas a Imunofluorescência Direta, e observadas ao microscópio de fluorescência, os resultados encontrados mostram-se nas tabelas 11, 12, 13 e 14

Tabela 11 - Prevalência de ovos de parasitas em amostras de salsa submetidas a Imunofluorescência direta (n=20)

Origem	N.º de amostras de salsa	N.º de amostras positivas	Prevalência (%)
MLx	17	0	0
MV	3	0	0

Tabela 12 - Prevalência de ovos de parasitas em amostras de coentros submetidos a Imunofluorescência direta (n=20)

Origem	N.º de amostras de coentros	N.º de amostras positivas	Prevalência (%)
MLx	17	0	0
MV	3	0	0

Tabela 13 - Prevalência de ovos de parasitas em amostras de hortelã submetidas a Imunofluorescência direta (n=20)

Origem	N.º de amostras de hortelã	N.º de amostras positivas	Prevalência (%)
MLx	17	0	0
MV	3	0	0

Tabela 14 - Prevalência de ovos de parasitas em amostras de agrião submetidos a Imunofluorescência direta (n=20)

Origem	N.º de amostras de agrião	N.º de amostras positivas	Prevalência (%)
MLx	17	0	0
MV	3	0	0

3.2. Análise Bacteriológica

As 68 amostras de salsa, coentros, hortelã e agrião provenientes dos 9 mercados de Lisboa (ML), tal como as 12 amostras provenientes do mercado de Viseu (MV) foram analisadas pelo método do Número Mais Provável para a deteção e quantificação (através da tabela 1) de coliformes fecais e de *Escherichia coli*.

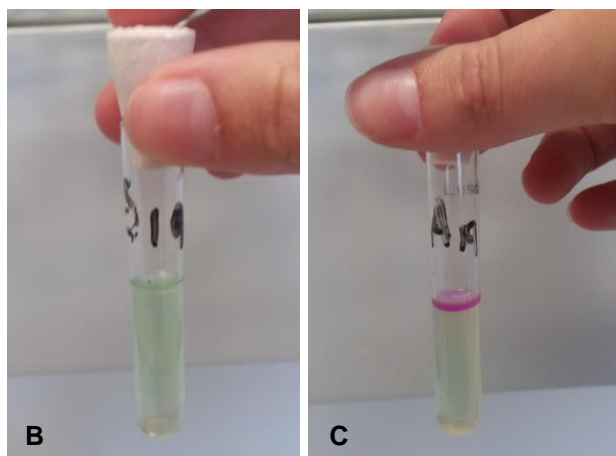
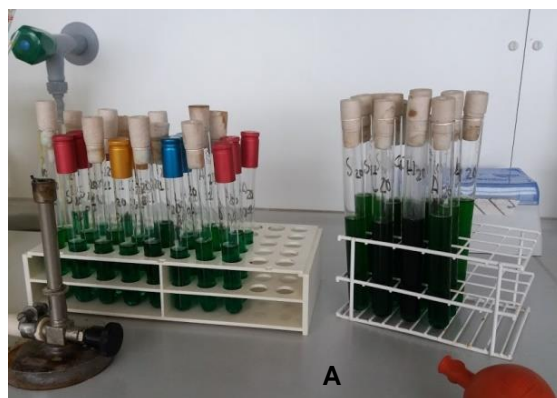


Figura 20 - A – Verificação de gás nos tubos de Durham; B – Teste de Indol negativo; C – Teste de Indol positivo.
Original

Apesar de haver amostras provenientes do mesmo mercado, foram tratadas de forma independente uma vez que foram adquiridas sempre em bancas diferentes. Aplicado em cada uma das amostras de salsa o método do Número Mais Provável para a deteção e quantificação de coliformes fecais (Tabela 15) e de *Escherichia coli* (Tabela 16) obtiveram-se os seguintes resultados:

Tabela 15 – NMP de Coliformes Fecais nas amostras de salsa.

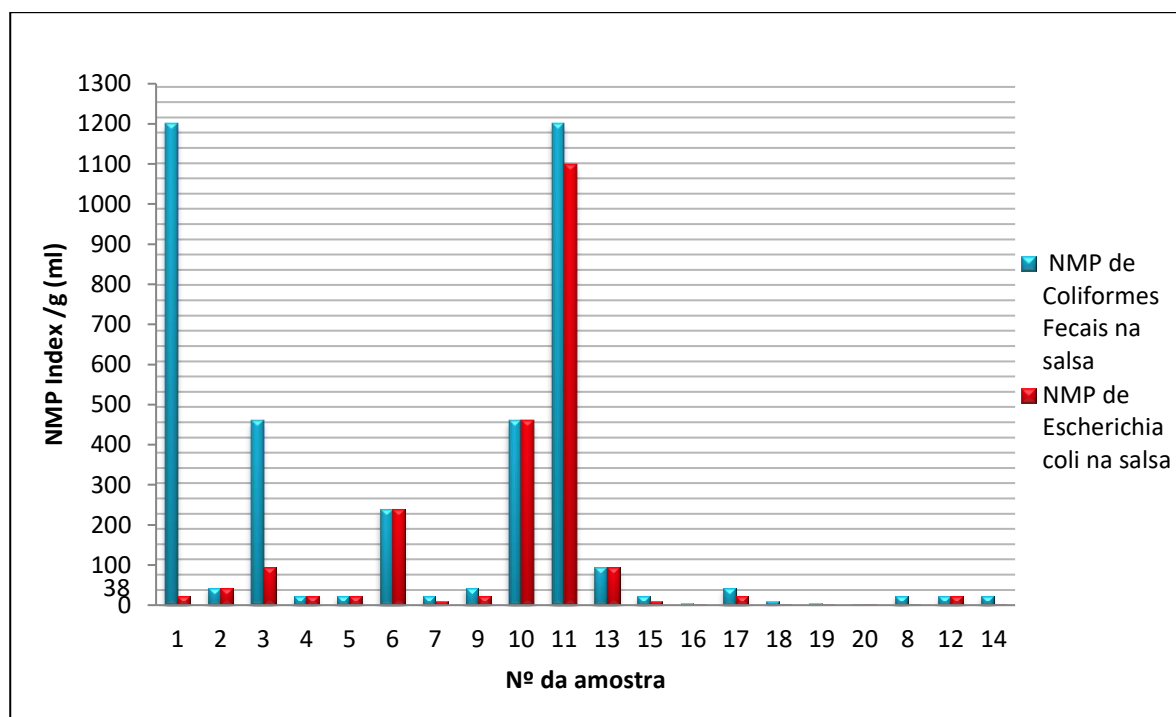
Nº da amostra	10 ml 1 ml 0,1ml Combinações positivas NMP Index /g (ml)					Intervalo Confiança (95%)	
						UFC/g Inf.	UFC/g Sup.
ORIGEM: MERCADOS DE LISBOA							
1	3	3	3	3-3-3	> 1100	420	-
2	3	1	0	3-1-0	43	9	180
3	3	3	1	3-3-1	460	90	2000
4	3	0	0	3-0-0	23	4,6	94
5	3	0	0	3-0-0	23	4,6	94
6	3	3	0	3-3-0	240	42	1000
7	3	0	0	3-0-0	23	4,6	94
9	3	1	0	3-1-0	43	9	180
10	3	3	1	3-3-1	460	90	2000
11	3	3	3	3-3-3	> 1100	420	-
13	3	2	0	3-2-0	93	18	420
15	3	0	0	3-0-0	23	4,6	94
16	1	0	0	1-0-0	3,6	0,17	18
17	3	1	0	3-1-0	43	9	180
18	2	0	0	2-0-0	9,2	1,4	38
19	1	0	0	1-0-0	3,6	0,17	18
20	0	0	0	0-0-0	< 3	-	9,5
ORIGEM: MERCADOS DE VISEU							
8	3	0	0	3-0-0	23	4,6	94
12	3	0	0	3-0-0	23	4,6	94
14	3	0	0	3-0-0	23	4,6	94

Tabela 16 – NMP de *Escherichia coli* nas amostras de salsa.

Nº da amostra	10 ml 1 ml 0,1ml Combinações positivas NMP Index /g (ml)					Intervalo Confiança (95%)	
						UFC/g Inf.	UFC/g Sup.
ORIGEM: MERCADOS DE LISBOA							
1	3	0	0	3-0-0	23	4,6	94
2	3	1	0	3-1-0	43	9	180
3	3	2	1	3-2-1	93	18	420
4	3	0	0	3-0-0	23	4,6	94
5	3	0	0	3-0-0	23	4,6	94
6	3	3	0	3-3-0	240	42	1000
7	2	0	0	2-0-0	9,2	4,6	94
9	3	0	0	3-0-0	23	4,6	94
10	3	3	1	3-3-1	460	90	2000
11	3	3	2	3-3-2	1100	180	4100
13	3	2	0	3-2-0	93	18	420
15	2	0	0	2-0-0	9,2	1,4	38
16	0	0	0	0-0-0	< 3	-	9,5
17	3	0	0	3-0-0	23	4,6	94
18	0	0	0	0-0-0	< 3	-	9,5
19	0	0	0	0-0-0	< 3	-	9,5
20	0	0	0	0-0-0	< 3	-	9,5
ORIGEM: MERCADOS DE VISEU							
8	0	0	0	0-0-0	< 3	4,6	94
12	3	0	0	3-0-0	23	4,6	94
14	0	0	0	0-0-0	< 3	-	9,5

No Gráfico 1 está representado o NMP de Coliformes Fecais e *Escherichia coli* nas amostras de salsa.

Gráfico 1 – NMP de Coliformes Fecais e *Escherichia coli* nas amostras de salsa.



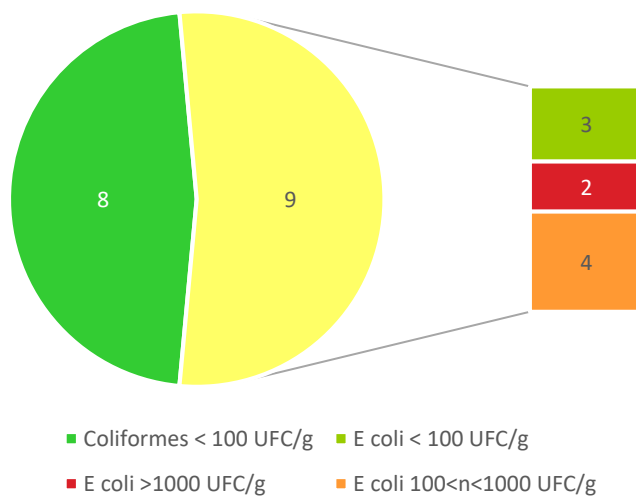
A Tabela 17 representa a distribuição das amostras de salsa de acordo com os valores de referência estipulados no Regulamento (CE) N.º 1441/2007.

Tabela 17 – Distribuição das amostras de salsa de acordo com os valores de referência.

Origem	N.º de amostras de salsa (n)	Valores de UFC/g					
		N.º de amostras com valores < 100 UFC/g		N.º de amostras com valores >100 UFC/g			
				100<n<1000		>1000	
		C.Fecais	<i>E coli</i>	C.Fecais	<i>E coli</i>	C.Fecais	<i>E coli</i>
MLx	17	8	11	5	4	4	2
MV	3	3	3	0	0	0	0

O Gráfico 2 representa a distribuição das amostras de salsa de acordo com os valores de referência nos mercados de Lisboa.

Gráfico 2 - Distribuição das amostras de salsa de acordo com os valores de referência nos mercados de Lisboa.



Aplicado em cada uma das amostras de coentros o método do Número Mais Provável para a deteção e quantificação de coliformes fecais (Tabela 18) e de *Escherichia coli* (Tabela 19) obtiveram-se os seguintes resultados:

Tabela 18 – NMP de Coliformes Fecais nas amostras de coentros.

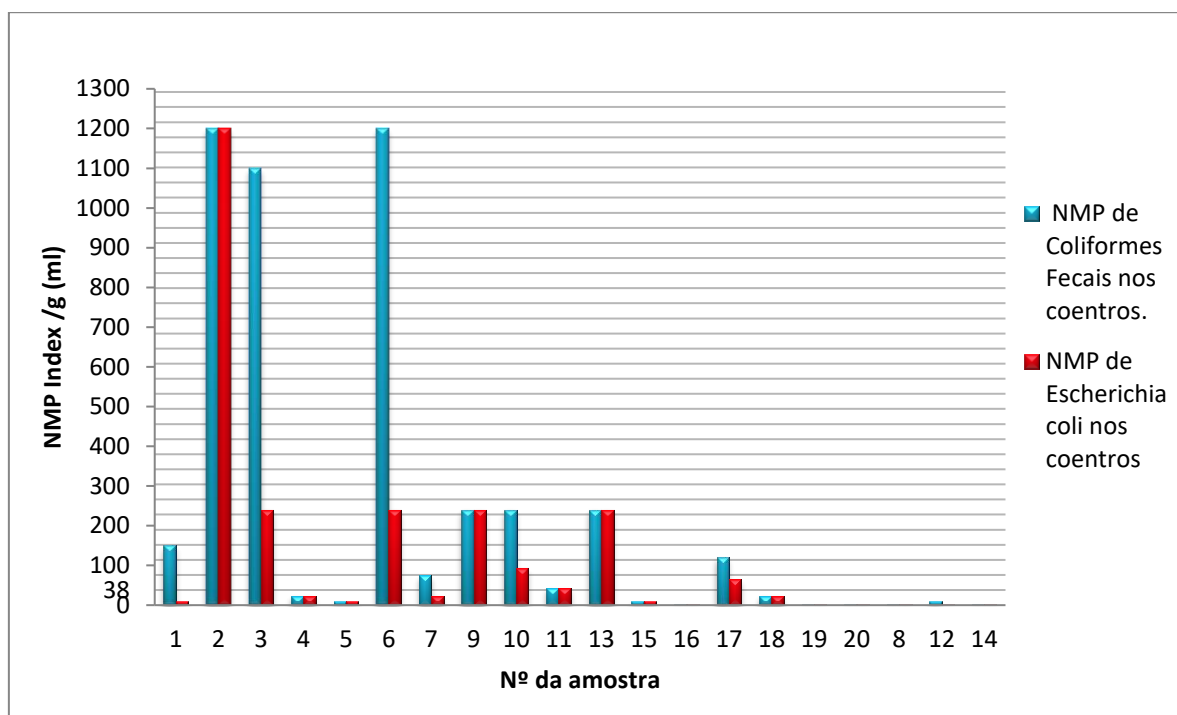
Nº da amostra	10 ml 1 ml 0,1ml Combinções positivas NMP Index /g (ml)					Intervalo Confiança (95%)	
						UFC/g Inf.	UFC/g Sup.
ORIGEM: MERCADOS DE LISBOA							
1	3	2	1	3-2-1	150	37	420
2	3	3	3	3-3-3	> 1100	420	-
3	3	3	2	3-3-2	1100	180	4100
4	3	0	0	3-0-0	23	4,6	94
5	2	0	0	2-0-0	9,2	1,4	38
6	3	3	3	3-3-3	> 1100	420	-
7	3	1	0	3-1-0	75	17	200
9	3	3	0	3-3-0	240	42	1000
10	3	3	0	3-3-0	240	42	1000
11	3	1	0	3-1-0	43	9	180
13	3	3	0	3-3-0	240	42	1000
15	2	0	0	2-0-0	9,2	1,4	38
16	0	0	0	0-0-0	< 3	-	9,5
17	3	1	2	3-1-2	120	37	420
18	3	0	0	3-0-0	23	4,6	94
19	0	0	0	0-0-0	< 3	-	9,5
20	0	0	0	0-0-0	< 3	-	9,5
ORIGEM: MERCADOS DE VISEU							
8	0	0	0	0-0-0	< 3	-	9,5
12	2	0	0	2-0-0	9,2	1,4	38
14	0	0	0	0-0-0	< 3	-	9,5

Tabela 19 – NMP de *Escherichia coli* nas amostras coentros.

Nº da amostra	10 ml 1 ml 0,1ml Combinções positivas NMP Index /g (ml)					Intervalo Confiança (95%)	
						UFC/g Inf.	UFC/g Sup.
ORIGEM: MERCADOS DE LISBOA							
1	2	2	0	2-2-0	9,2	1,4	38
2	3	3	3	3-3-3	> 1100	420	-
3	3	3	0	3-3-0	240	42	1000
4	2	0	0	2-0-0	23	4,6	94
5	2	0	0	2-0-0	9,2	1,4	38
6	3	3	0	3-3-0	240	42	1000
7	3	0	0	3-0-0	23	4,6	9,4
9	3	3	0	3-3-0	240	42	1000
10	3	2	0	3-2-0	93	18	420
11	3	1	0	3-1-0	43	9	180
13	3	3	0	3-3-0	240	42	1000
15	2	0	0	2-0-0	9,2	1,4	38
16	0	0	0	0-0-0	< 3	-	9,5
17	3	0	2	3-0-2	64	17	180
18	3	0	0	3-0-0	23	4,6	94
19	0	0	0	0-0-0	< 3	-	9,5
20	0	0	0	0-0-0	< 3	-	9,5
ORIGEM: MERCADOS DE VISEU							
8	0	0	0	0-0-0	< 3	-	9,5
12	0	0	0	0-0-0	< 3	-	9,5
14	0	0	0	0-0-0	< 3	-	9,5

No Gráfico 3 está representado o NMP de Coliformes Fecais e *Escherichia coli* nas amostras de coentros.

Gráfico 3 - NMP de Coliformes Fecais e *Escherichia coli* nas amostras de coentros.



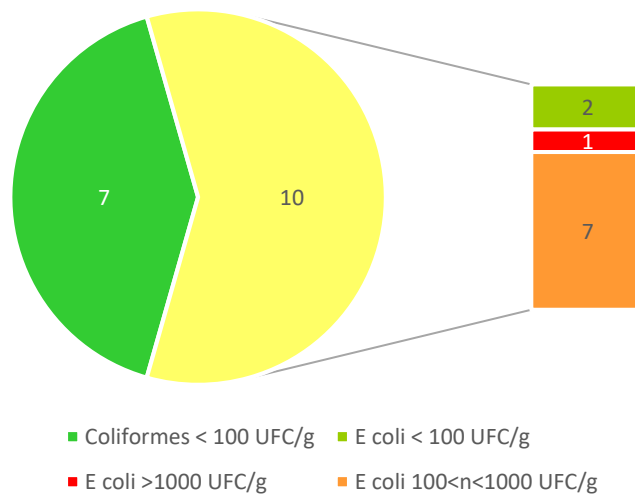
A tabela 20 representa a distribuição das amostras de coentros de acordo com os valores de referência estipulados no Regulamento (CE) N.º 1441/2007.

Tabela 20 - Distribuição das amostras de coentros de acordo com os valores de referência.

Origem	N.º de amostras de coentros (n)	Valores de UFC/g					
		N.º de amostras com valores < 100 UFC/g		N.º de amostras com valores >100 UFC/g			
				100<n<1000		>1000	
		C.Fecais	<i>E coli</i>	C.Fecais	<i>E coli</i>	C.Fecais	<i>E coli</i>
MLx	17	7	9	7	7	3	1
MV	3	3	3	0	0	0	0

O Gráfico 4 representa a distribuição das amostras de coentros de acordo com os valores de referência nos mercados de Lisboa.

Gráfico 4 - Distribuição das amostras de coentros de acordo com os valores de referência nos mercados de Lisboa.



Aplicado em cada uma das amostras de hortelã o método do Número Mais Provável para a deteção e quantificação de coliformes fecais (Tabela 24) e de *Escherichia coli* (Tabela 25) obtiveram-se os seguintes resultados:

Tabela 21 – NMP de Coliformes Fecais nas amostras de hortelã.

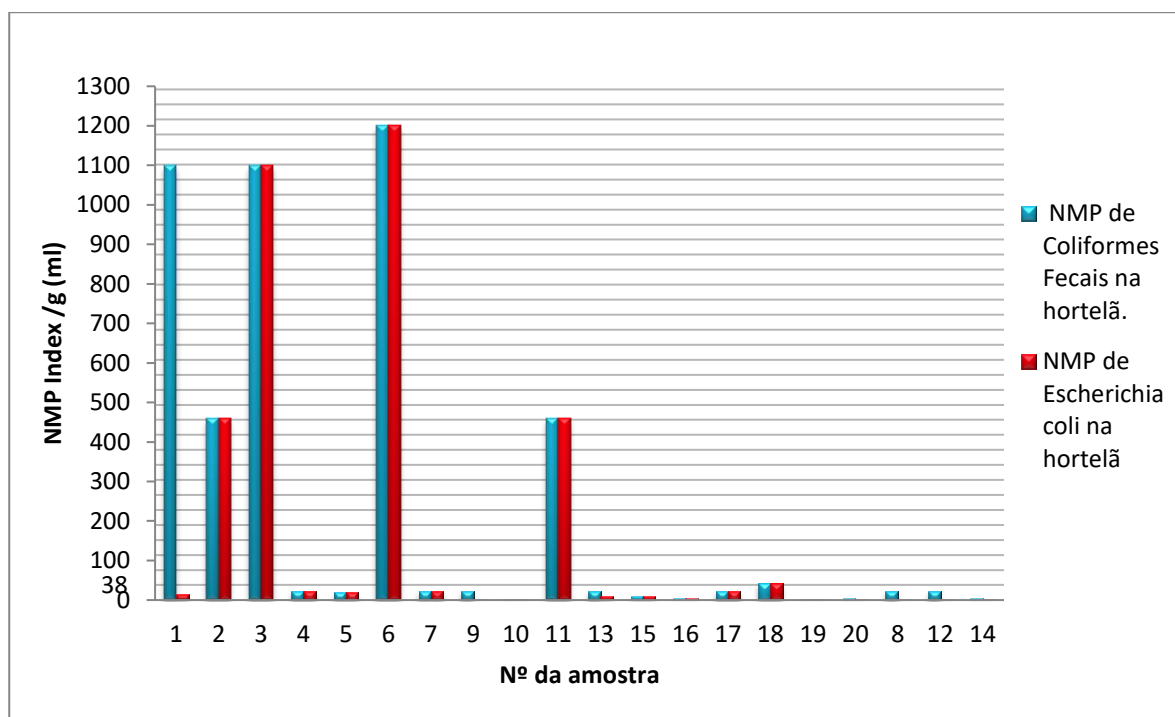
Nº da amostra	10 ml 1 ml 0,1ml Combinações positivas NMP Index /g (ml)					Intervalo Confiança (95%)	
						UFC/g Inf.	UFC/g Sup.
ORIGEM: MERCADOS DE LISBOA							
1	3	3	2	3-3-2	1100	180	4100
2	3	3	1	3-3-1	460	90	2000
3	3	3	2	3-3-2	1100	180	4100
4	3	0	0	3-0-0	23	4,6	94
5	2	1	1	2-1-1	20	4,5	43
6	3	3	3	3-3-3	> 1100	420	-
7	3	0	0	3-0-0	23	4,6	94
9	3	0	0	3-0-0	23	4,6	94
10	0	0	0	0-0-0	< 3	-	9,5
11	3	3	1	3-3-1	460	90	2000
13	3	0	0	3-0-0	23	4,6	94
15	2	0	0	2-0-0	9,2	1,4	38
16	1	0	0	1-0-0	3,6	0,17	18
17	3	0	0	3-0-0	23	4,6	94
18	3	1	0	3-1-0	43	9	180
19	0	0	0	0-0-0	< 3	-	9,5
20	1	0	0	1-0-0	3,6	0,17	18
ORIGEM: MERCADOS DE VISEU							
8	3	0	0	3-0-0	23	4,6	94
12	3	0	0	3-0-0	23	4,6	94
14	1	0	0	1-0-0	3,6	-	9,5

Tabela 22 – NMP de *Escherichia coli* nas amostras de hortelã.

Nº da amostra	10 ml 1 ml 0,1ml Combinações positivas NMP Index /g (ml)					Intervalo Confiança (95%)	
						UFC/g Inf.	UFC/g Sup.
ORIGEM: MERCADOS DE LISBOA							
1	2	0	1	2-0-1	14	3,6	42
2	3	3	1	3-3-1	460	90	2000
3	3	3	2	3-3-2	1100	180	4100
4	3	0	0	3-0-0	23	4,6	94
5	2	1	1	2-1-1	20	4,5	43
6	3	3	3	3-3-3	> 1100	420	-
7	3	0	0	3-0-0	23	4,6	94
9	0	0	0	0-0-0	< 3	-	9,5
10	0	0	0	0-0-0	< 3	-	9,5
11	3	3	1	3-3-1	460	90	2000
13	2	0	0	2-0-0	9,2	1,4	38
15	2	0	0	2-0-0	9,2	1,4	38
16	1	0	0	1-0-0	3,6	0,17	18
17	3	0	0	3-0-0	23	4,6	94
18	3	1	0	3-1-0	43	9	180
19	0	0	0	0-0-0	< 3	-	9,5
20	0	0	0	0-0-0	<3	-	9,5
ORIGEM: MERCADOS DE VISEU							
8	0	0	0	0-0-0	< 3	-	9,5
12	0	0	0	0-0-0	< 3	-	9,5
14	0	0	0	0-0-0	<3	-	9,5

No Gráfico 7 está representado o NMP de Coliformes Fecais e *Escherichia coli* nas amostras de hortelã.

Gráfico 5 - NMP de Coliformes Fecais e *Escherichia coli* nas amostras hortelã.



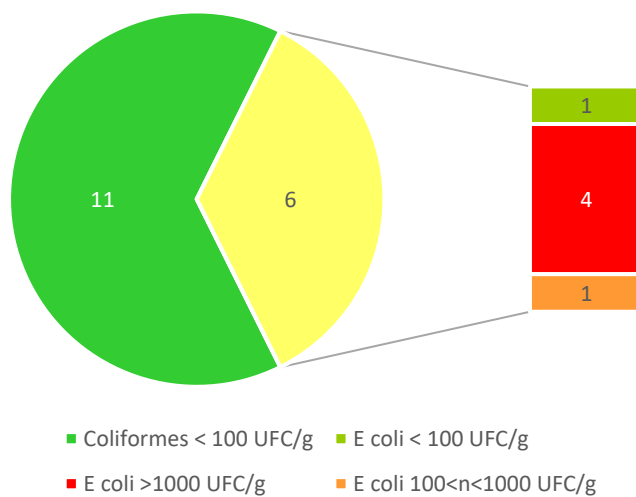
A Tabela 26 representa a distribuição das amostras de hortelã de acordo com os valores de referência estipulados no Regulamento (CE) N.º 1441/2007.

Tabela 23 - Distribuição das amostras de hortelã de acordo com os valores de referência.

Origem	N.º de amostras de hortelã (n)	Valores de UFC/g					
		N.º de amostras com valores < 100 UFC/g		N.º de amostras com valores >100 UFC/g			
				100<n<1000		>1000	
		Fecais	<i>E coli</i>	Fecais	<i>E coli</i>	Fecais	<i>E coli</i>
MLx	17	11	12	1	1	5	4
MV	3	3	3	0	0	0	0

O Gráfico 8 representa a distribuição das amostras de hortelã de acordo com os valores de referência nos mercados de Lisboa.

Gráfico 6 - Distribuição das amostras de hortelã de acordo com os valores de referência nos mercados de Lisboa



Aplicado em cada uma das amostras de agrião o método do Número Mais Provável para a deteção e quantificação de coliformes fecais (Tabela 21) e de *Escherichia coli* (Tabela 22) obtiveram-se os seguintes resultados:

Tabela 24 – NMP de Coliformes Fecais nas amostras de agriões.

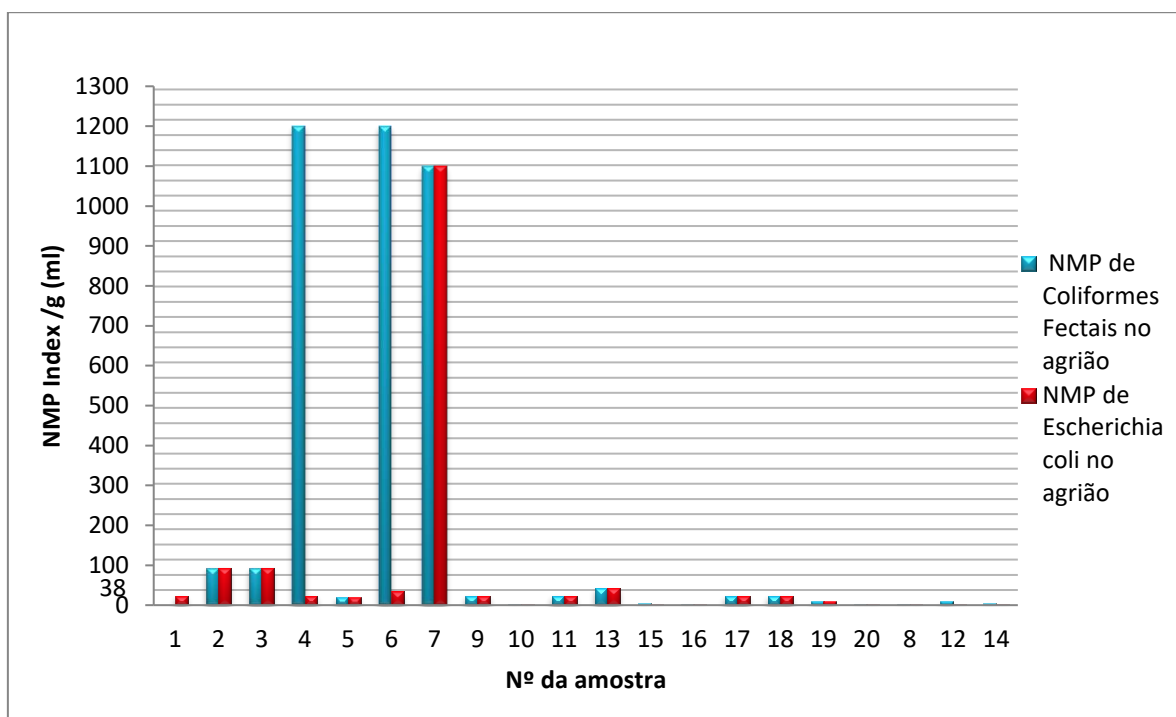
Nº da amostra	10 ml 1 ml 0,1ml Combinções positivas NMP Index /g (ml)					Intervalo Confiança (95%)	
						UFC/g Inf.	UFC/g Sup.
ORIGEM: MERCADOS DE LISBOA							
1	3	0	0	3-0-0	23	4,6	94
2	3	2	0	3-2-0	93	18	420
3	3	2	0	3-2-0	93	18	420
4	3	3	3	3-3-3	> 1100	420	-
5	2	1	1	2-1-1	20	4,5	42
6	3	3	3	3-3-3	> 1100	420	-
7	3	3	2	3-3-2	1100	180	4100
9	3	0	0	3-0-0	23	4,6	94
10	0	0	0	0-0-0	< 3	-	9,5
11	3	0	0	3-0-0	23	4,6	94
13	3	1	0	3-1-0	43	9	180
15	1	0	0	1-0-0	3,6	0,17	18
16	0	0	0	0-0-0	< 3	-	9,5
17	3	0	0	3-0-0	23	4,6	94
18	3	0	0	3-0-0	23	4,6	94
19	2	0	0	2-0-0	9,2	1,4	38
20	0	0	0	0-0-0	< 3	-	9,5
ORIGEM: MERCADOS DE VISEU							
8	0	0	0	0-0-0	< 3	-	9,5
12	2	0	0	2-0-0	9,2	1,4	38
14	1	0	0	1-0-0	3,6	-	9,5

Tabela 25 – NMP de *Escherichia coli* nas amostras de agriões.

Nº da amostra	10 ml 1 ml 0,1ml Combinções positivas NMP Index /g (ml)					Intervalo Confiança (95%)	
						UFC/g Inf.	UFC/g Sup.
ORIGEM: MERCADOS DE LISBOA							
1	3	0	0	3-0-0	23	4,6	94
2	3	2	0	3-2-0	93	18	420
3	3	2	0	3-2-0	93	18	420
4	3	0	0	3-0-0	23	4,6	94
5	2	1	1	2-1-1	20	4,5	42
6	2	2	2	2-2-2	35	8,7	94
7	3	3	2	3-3-2	1100	180	4100
9	3	0	0	3-0-0	23	4,6	94
10	0	0	0	0-0-0	< 3	-	9,5
11	3	0	0	3-0-0	23	4,6	94
13	3	1	0	3-1-0	43	9	180
15	0	0	0	0-0-0	<3	-	9,5
16	0	0	0	0-0-0	< 3	-	9,5
17	3	0	0	3-0-0	23	4,6	94
18	3	0	0	3-0-0	23	4,6	94
19	2	0	0	2-0-0	9,2	1,4	38
20	0	0	0	0-0-0	< 3	-	9,5
ORIGEM: MERCADOS DE VISEU							
8	0	0	0	0-0-0	< 3	-	9,5
12	0	0	0	0-0-0	<3	-	9,5
14	0	0	0	0-0-0	<3	-	9,5

No Gráfico 5 está representado o NMP de Coliformes Fecais e *Escherichia coli* nas amostras de agrião.

Gráfico 7 - NMP de Coliformes Fecais e *Escherichia coli* nas amostras de agrião.



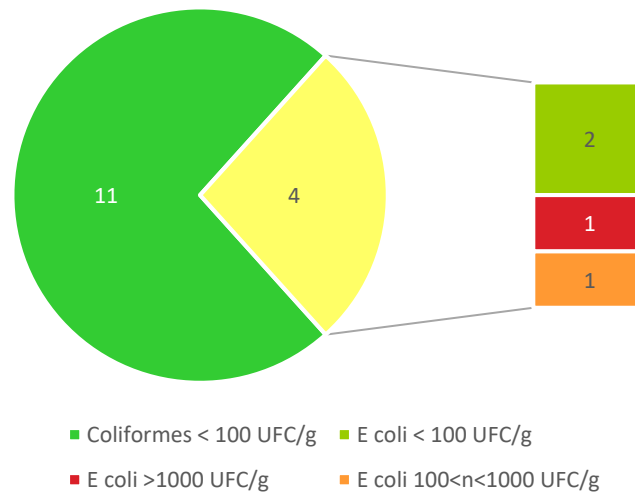
A tabela 23 representa a distribuição das amostras de agriões de acordo com os valores de referência estipulados no Regulamento (CE) N.º 1441/2007.

Tabela 26 - Distribuição das amostras de agrião de acordo com os valores de referência.

Origem	N.º de amostras de agrião (n)	Valores de UFC/g					
		N.º de amostras com valores < 100 UFC/g		N.º de amostras com valores >100 UFC/g			
				100<n<1000		>1000	
		C.Fecais	<i>E coli</i>	C. Fecais	<i>E coli</i>	C. Fecais	<i>E coli</i>
MLx	17	11	13	3	3	3	1
MV	3	3	3	0	0	0	0

O Gráfico 6 representa a distribuição das amostras de agrião de acordo com os valores de referência nos mercados de Lisboa.

Gráfico 8 - Distribuição das amostras de agrião de acordo com os valores de referência nos mercados de Lisboa.



4. Discussão

Os resultados obtidos pelo método de concentração por sedimentação espontânea, pelo método de coloração Ziehl-Neelsen e pelo método de Imunofluorescência Direta revelaram todas as amostras negativas para a presença de formas parasitárias, o que está em desacordo com outros trabalhos realizados e descritos por vários autores. De facto, um estudo realizado por Dixon *et al.* (2013), relata a presença de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em saladas de folhas verdes, embaladas, prontas a comer, adquiridas no mercado em Ontário, no Canadá. Um total de 544 amostras comerciais foram recolhidas entre abril de 2009 e março de 2010 e incluíram uma variedade de saladas com mistura de folhas verdes ou folhas verdes individuais. A maioria destes produtos foram cultivados nos Estados Unidos, mas outros no Canadá e no México. Verificou-se uma prevalência relativamente alta de *Cryptosporidium* e *Giardia* nas saladas embaladas.

El Said Said (2012), refere que em Alexandria, no Egipto foram detetados parasitas intestinais em 31,7% das amostras de vegetais crus examinadas através da coloração Ziehl-Neelsen. Os parasitas incluíram ovos de *Ascaris lumbricoides*, de *Toxocara* spp. e de *Hymenolepis nana*, quistos de *Giardia* spp., oocistos de *Cryptosporidium* spp. e de *Cyclospora* spp. e esporos de *Microsporidium* spp. O maior número de amostras contaminadas eram de rúcula (46,7%), enquanto o menor número de amostras contaminadas eram de cebolinho (13,3%). Os oocistos *Cryptosporidium* spp. foram considerados o parasita detetado em maior quantidade em vegetais crus (29,3%). Seguidos pelos esporos de *Microsporidium* spp. (25,3%), oocistos de *Cyclospora* spp. (21,3%), ovos de *A. lumbricoides* (20,3%), ovos de *Toxocara* spp. (19%), quistos *Giardia* spp. (6,7%) e, finalmente, ovos de *H. nana* (2,6%). Não foi possível estabelecer entre a contaminação e a estação do ano, no entanto, o número foi significativamente maior na primavera e verão em comparação com o inverno e outono.

Já em Teerão, no Irão, Ranjbar-Bahadori, Mostoophi, & Shemshadi (2013), determinaram o nível de contaminação de *Cryptosporidium* em diferentes produções de vegetais tendo sido recolhidas amostras entre junho e julho de 2012. Foi usado o método de concentração de sedimento seguido de coloração Ziehl-Neelsen, determinando a presença de oocistos de *Cryptosporidium*. Estavam contaminadas 6,6% das amostras de vegetais estudadas, sendo o cebolinho o mais contaminado (14,8%) dos produtos hortícolas testados.

Na Costa Rica, Calvo *et al.* (2004), determinaram a presença de *Cyclospora* spp., e *Cryptosporidium* spp. em alface, em salsa, em coentros, em morangos e em amoras adquiridos em 5 mercados agrícolas locais durante o segundo semestre de 2001 e o primeiro de 2002. Foram avaliadas 50 amostras de cada produto, sendo 25 na estação seca e 25 na estação chuvosa. A determinação dos parasitas foi feita através da técnica de coloração de Ziehl-Neelsen. Todos os produtos avaliados apresentaram, pelo menos uma vez, *Cryptosporidium* spp. e/ou *Cyclospora* spp. O *Cryptosporidium* estava presente em todos os produtos, com exceção dos morangos e *Cyclospora* foi isolado apenas na alface durante a estação seca.

Cook *et al.* (2007), referem um método para a detecção de quistos de *Giardia duodenalis* em alface, que posteriormente utilizaram para analisar saladas quanto à presença de quistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium*. O método baseia-se em quatro etapas básicas: extração de quistos dos alimentos, concentração do extrato e separação dos quistos dos materiais alimentares, coloração dos quistos para permitir a visualização e sua identificação com microscópio de fluorescência. Foi usado um filtro verde para visualizar a coloração Texas-Red. O método recuperou $46,0\% \pm 19,0\%$ (n 30) de quistos contaminados artificialmente em 30g de alface. As recuperações dos quistos de *Giardia* e dos oocistos de *Cryptosporidium* foram $36,5\% \pm 14,3\%$ e $36,2\% \pm 19,7\%$ (n 20), respetivamente. Amostras de agrião biológico, espinafre e rúcula continham um quisto de *Giardia* em 50g de amostra, como um contaminante de superfície.

A técnica de Número Mais Provável (NMP) permitiu estimar o teor de microrganismos viáveis presentes nas amostras em análise.

Uma vez que se tratavam de vegetais para consumo, seria teoricamente espectável, que as amostras revelassem resultados satisfatórios, apresentando um baixo número (<100 UFC/g) de *E. coli*, de acordo com o Regulamento (CE) N.º 1441/2007. Das amostras analisadas, 20%, 10%, 5% e 5% tinham contagens superiores a 1000 UFC/g de *E. coli*, para a hortelã, a salsa, o agrião, e os coentros, respetivamente. Estes resultados foram obtidos nos Mercados de Lisboa, pois nos de Viseu todas as amostras foram negativas, para qualquer dos agentes.

Em Maryland, EUA, Valentin-Bon, Jacobson, Monday & Feng (2008), analisaram 100 amostras de alface e espinafres embalados, e obtiveram contagens bacterianas totais médias de 10^7 UFC/g, com resultados entre $<10^4$ a 10^8 UFC/g. Em 55

amostras foram encontrados NMP ≥ 11000 /g de coliformes, e *Escherichia coli* foi detetada em 16 amostras, mas nenhuma contagem de *E. coli* excedeu 10 UFC/g.

Na Tailândia, Dhiraputra *et al.* (2005), estudaram a contaminação bacteriana de legumes frescos a utilizar em 14 hospitais. A contagem de bactérias, realizada antes da limpeza dos vegetais, incidiu em bactérias aeróbias totais, coliformes fecais e *Escherichia coli*, em alface romana, cebola, salsa, aipo e tomate. Das 178 amostras, 106 (59,6%) continham coliformes fecais $>10^3$ UFC/g, e 78 amostras (43,8%) continham *E. coli* >10 UFC/g, concluindo que uma elevada percentagem das amostras de vegetais ultrapassavam os limites de contaminação admitidos para estes produtos.

Zhang, Leroux, Trudel, & Bietlot (2016), estudaram uma ampla gama de produtos disponíveis no mercado canadiano. As amostras (n = 31.329) foram recolhidas em todo o Canadá, ao longo de quatro anos (2009-2013), e consistiu em vegetais folhosos (n = 12.073), em ervas (n = 6032), em cebolinho (n = 3381), em meloas (n = 3230), em tomates (n = 4837) e em bagas (n = 1776). A prevalência de contaminação bacteriana observada durante este estudo foi geralmente muito baixa, com intervalos de prevalência variando de [0, 0,08%] nos tomates a [0,79, 1,30%] em ervas frondosas. A maioria das amostras que foram relatadas como "positivas para contaminação bacteriana" apresentaram níveis de *E. coli* > 100 UFC/g.

A higiene da manipulação e dos manipuladores também podem ser um fator importante a considerar na contaminação e disseminação de parasitas e bactérias nos vegetais (Neves *et al.*, 2010).

Das amostras analisadas neste trabalho, não é conhecido o modo de produção dos vegetais, pelo que não se podem tirar ilações sobre a influência ou não da produção nos resultados analíticos. Por outro lado, as amostras foram adquiridas entre os meses de outubro de 2015 a fevereiro de 2016, o localiza a sua produção no Outono e Inverno. Informações disponibilizadas pelo Instituto Português do Mar e da Atmosfera, dizem que na zona de Lisboa e Grande Centro, se observou uma humidade relativa do ar, nestes períodos, de aproximadamente 90% e o período de chuvas acumulado foi de 79 mm, 11mm, 17mm, 43mm e 27mm nos meses de outubro, novembro, e dezembro de 2015 e janeiro e fevereiro de 2016, respetivamente (IPMA, 2016).

É sabido que as alterações climáticas afetam a quantidade da água disponível e também podem contribuir para a sua qualidade; o aumento dos períodos de seca

potenciam o impacto dos fenómenos de poluição, nomeadamente os relacionados com as descargas de águas residuais domésticas ou industriais, uma vez que o meio hídrico possui menor capacidade de oxigenação e autodepuração, contribuindo para o aumento da carga microbiana e química das linhas de água, o que pode ter repercussões no aumento dos surtos epidemiológicos associados à componente hídrica. A alteração esperada nos padrões de precipitação podem, em algumas zonas do país, facilitar a ocorrência de cheias, podendo contribuir para o arrastamento de inertes, de pesticidas, hidrocarbonetos e outros poluentes para o meio hídrico, contaminando as linhas de água e ao mesmo tempo aumentando o risco de contaminação cruzada entre as redes de esgotos e a rede de distribuição de água potável, ficando a água mais exposta à contaminação por microrganismos potencialmente patogénicos e podendo estar na origem de graves problemas de saúde pública. Assim, prevê-se que exista um aumento da incidência de doenças com origem hídrica e alimentar, quer no caso da *Salmonella*, *Cryptosporidium* spp, *Giardia*, *Cyclospora*, *Campylobacter*, *Listeriose* e *Escherichia coli*, entre outros. Na época de Verão existe uma maior incidência de doenças diarreicas (infecções intestinais) em que a *E.coli* e as Salmoneloses poderão ocorrer com maior prevalência; julga-se mesmo que pode acontecer um aumento de 5% a 10% por cada grau de aumento da temperatura. Os fenómenos de pluviosidade intensa já foram associados a uma maior probabilidade de detetar quistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium*. A temperatura e a humidade relativa influenciam a taxa de multiplicação das bactérias e dos protozoários patogénicos, assim como influenciam a taxa de sobrevivência dos enterovírus no ambiente (DGS, 2011).

5. Conclusões e Perspetivas Futuras

Os alimentos vegetais são expostos a alteração de condições durante as várias fases por que passam, como sejam plantação, colheita, preparação e distribuição. Essas etapas são importantes, pois podem aumentar o potencial da sua contaminação por diversos agentes. A implementação de boas práticas de higiene, desde a produção primária até ao consumidor final, contribui para a minimização de contaminação indesejada dos produtos alimentares, e ajuda à prevenção de doenças veiculadas por alimentos. Observados os resultados da análise parasitológica conclui-se que não houve contaminação por parasitas em nenhuma das 20 amostras de cada vegetal em estudo, o que coloca os legumes em excelentes condições higiénicas, concluindo-se que possivelmente não foram utilizados estrumes frescos nem submetidos a contaminação parasitária com origem animal (por ex cães e/ou gatos), que terão sido obtidos através de irrigação com água potável, e que deverá ter sido utilizada a lavagem por arrasto após a colheita, e manipulados adequadamente nas etapas de acondicionamento, transporte e comercialização.

No que diz respeito à análise bacteriológica, conclui-se que há um considerável número de amostras insatisfatórias no que se refere a *E. coli*, surgindo os piores resultados na hortelã e no agrião dos mercados de Lisboa, o que indica que provavelmente a água de rega não teria qualidade microbiológica, ou houve manipulação inadequada do produto durante o acondicionamento, transporte e comercialização, o que não se verifica nas amostras oriundas de Viseu, visto todos os resultados terem sido satisfatórios.

Penso que foi pena não incluir um inquérito aos vendedores para aferir os aspetos relacionados com o modo de produção, a origem e o sistema de aquisição/ temperatura/ manipulação dos vegetais

Conclui-se que haverá ainda muito a melhorar de forma a evitar contaminações bacteriológicas nos legumes frescos consumidos em cru, sendo necessário um maior controlo nas várias etapas do processo anteriores à comercialização para controlar o risco.

IV. Referências Bibliográficas

- Abelho, M. (2011). Protocolos de Microbiologia Ambiental. Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Coimbra. Obtido de http://www.esac.pt/Abelho/MicroAmbiental/Protocolos%5B3%5D_2011_2012.pdf
- Adam, R. D. (2001). Biology of *Giardia lamblia*. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(3), 447–475. <https://doi.org/10.1128/CMR.14.3.447-475.2001>
- Almeida, L. M. de. (2010). Os serviços de saúde pública e o sistema de saúde. *Revista Portuguesa de Saúde Pública*, 28(1), 79–92.
- Andrews-Polymenis, H. L., Bäumler, A. J., McCormick, B. A., & Fang, F. C. (2010). Taming the Elephant: Salmonella Biology, Pathogenesis, and Prevention. *Infection and Immunity*, 78(6), 2356–2369. <https://doi.org/10.1128/IAI.00096-10>
- Bastos, R. K., Bevilacqua, P. D., Nascimento, L. E., Carvalho, G. R., & Silva, C. V. (2000). Coliformes como Indicadores da Qualidade da Água: Alcance e Limitações. *XXVII Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental*, 12.
- Bioquell UK Ltd. (2016). Decontamination | HPV Decontamination | Hydrogen Peroxide Vapour. Obtido 19 de Junho de 2016, de <http://www.bioquell.com/en-uk/>
- Bowman, D. D., Lynn, R. C., & Georgi, J. R. (2003). *Georgis' Parasitology for Veterinarians* (8.^a ed.). St. Louis, Mo: Saunders.
- Calvo, M., Carazo, M., Arias, M. L., Chaves, C., Monge, R., & Chinchilla, M. (2004). Prevalence of *Cyclospora* spp., *Cryptosporidium* spp, microsporidia and fecal coliform determination in fresh fruit and vegetables consumed in Costa Rica. *Archivos Latinoamericanos De Nutricion*, 54(4), 428–432.
- Casemore, D.P. (1991) Laboratory methods for diagnosing cryptosporidiosis. *Journal of Clinical Pathology* 44, 445-451.

- Centers for Disease Control and Prevention. (2013). Antibiotic Resistance Threats in the United States. Obtido de <http://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>
- Chin, J. (Ed.). (2000). *Control of communicable diseases manual* (17.^a ed.). Washington: American Public Health Association.
- Conte, M. P., Mastromarino, P., & Esculapio. (2015). *Microbiologia medica, batteriologia e virologia*. Bologna: Esculapio.
- Cook, N., Nichols, R. A. B., Wilkinson, N., Paton, C. A., Barker, K., & Smith, H. V. (2007). Development of a Method for Detection of *Giardia duodenalis* Cysts on Lettuce and for Simultaneous Analysis of Salad Products for the Presence of *Giardia* Cysts and *Cryptosporidium* Oocysts. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(22), 7388–7391. <https://doi.org/10.1128/AEM.00552-07>
- Crum-Cianflone, N. F. C. (2008). Salmonellosis and the GI Tract: More than Just Peanut Butter. *Current gastroenterology reports*, 10(4), 424–431.
- Dacach, N. G. (1984). *Saneamento básico* (2^a). Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos Editora.
- Denis, N., Zhang, H., Leroux, A., Trudel, R., & Bietlot, H. (2016). Prevalence and trends of bacterial contamination in fresh fruits and vegetables sold at retail in Canada. *Food Control*, 67, 225–234. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.02.047>
- Dhiraputra, C., Tiensasitorn, C., Techachaiwiwat, W., Jirapanakorn, N., Kachintorn, K., & Danchaivijitr, S. (2005). Bacterial contamination of vegetables served in hospitals. *Journal of the Medical Association of Thailand, Chotmaiher Thangphaet*, 88 Suppl 10, S42-48.
- Direção-Geral da Saúde. (2011). Alterações climáticas e saúde humana 'estado da arte'. Obtido de http://www.cienciaviva.pt/img/upload/Relat_Setor_ENAAC_Saude.pdf

- Dixon, B., Parrington, L., Cook, A., Pollari, F., & Farber, J. (2013). Detection of *Cyclospora*, *Cryptosporidium*, and *Giardia* in ready-to-eat packaged leafy greens in Ontario, Canada. *Journal of Food Protection*, 76(2), 307–313.
<https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-282>
- Donnenberg, M. S., & Kaper, J. B. (1992). Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 60(10), 3953–3961.
- El Said Said, D. (2012). Detection of parasites in commonly consumed raw vegetables. *Alexandria Journal of Medicine*, 48(4), 345–352.
<https://doi.org/10.1016/j.ajme.2012.05.005>
- FAO/WHO Codex Alimentarius Commission, Joint FAO/WHO Food Standards Programme, World Health Organization, Food and Agriculture Organization of the United Nations, & Joint FAO/WHO Codex Alimentarius Commission (Eds.). (2007). *Codex Alimentarius: fresh fruits and vegetables* (1st ed). Rome: World Health Organization, Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Fayer, R., Morgan, U., & Upton, S. J. (2000). Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *International Journal for Parasitology*, 30(12–13), 1305–1322.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations, & World Health Organization (Eds.). (2008). *Microbiological hazards in fresh leafy vegetables and herbs: meeting report*. Geneva: Rome: World Health Organization ; Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Food and Drug Administration. (2012). *Bad Bug Book, Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins* (2.^a ed.).
- Hoffman WA, Pons JA, Janer JL (1934). *The sedimentation-concentration method in schistosomiasis mansoni*. Puerto Rico J Publ Hlth Trop Med 9: 283-298.

- Instituto Português do Mar e da Atmosfera. (2016). Obtido 12 de Novembro de 2016, de <http://www.ipma.pt/pt/publicacoes/boletins.jsp?cmbDep=agr&cmbTema=bag&cmbAno=2016&idDep=agr&idTema=bag&curAno=2016>
- International Commission on Microbiological Specifications for Foods. (1996). *Microorganisms in food: 5 Characteristics of microbial pathogens*. London; New York: Blackie Academic & Professional.
- Lastovica, A. J., On, S. L. W., & Zhang, L. (2014). The Family Campylobacteraceae. Em E. Rosenberg, E. F. DeLong, S. Lory, E. Stackebrandt, & F. Thompson (Eds.), *The Prokaryotes* (pp. 307–335). Berlin: Springer Heidelberg. Obtido de http://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007/978-3-642-39044-9_274
- Medina, N. H., Gentil, R. M., Caraça, M., Suzuki, C. K., & Melles, H. H. (1996). Análise de exames de imunofluorescência direta para o diagnóstico de tracoma. *Revista de Saúde Pública*, 30(2), 135–140.
- Murray, P. R., Rosenthal, K. S., & Pfaller, M. A. (2009). *Medical microbiology* (6th ed). Philadelphia: Mosby/Elsevier.
- Neves, D. P., Melo, A. L., Linardi, P. M., & Vitor, R. W. A. (2010). *Parasitologia Humana* (11.^a ed.). Atheneu.
- Niyogi, S. K. (2005). Shigellosis. *Journal of Microbiology (Seoul, Korea)*, 43(2), 133–143.
- Oliveira, C. A. F. de, & Germano, P. M. L. (1992). Estudo da ocorrência de enteroparasitas em hortaliças comercializadas na região metropolitana de São Paulo, SP, Brasil: I-Pesquisa de helmintos. *Revista de Saúde Pública*, 26(4), 283–289.
- Ranjbar-Bahadori, S., Mostoophi, A., & Shemshadi, B. (2013). Study on *Cryptosporidium* contamination in vegetable farms around Tehran. *Trop Biomed*, 30(2), 193–198.

- Regulamento (CE) n.º 1441/2007 de 5 de Dezembro de 2007. JO L 322 de 7 de Dezembro de 2007, p. 12-29. Altera o Regulamento (CE) n.º 2073/2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios. Comissão das Comunidades Europeias. Bruxelas.
- Rey, L. (2006). *Parasitologia* (4ª edição). Vargem Grande Paulista; São Paulo: Guanabara Koogan.
- Ringqvist, E. (2009). *Host-pathogen responses during Giardia infections*. Acta Universitatis Upsaliensis, Uppsala.
- Rodríguez, J. C., & Royo, G. (2001). *Cryptosporidium y criptosporidiosis* (p. 7). Hospital General Universitario de Elche. Universidad Miguel Hernández. Elche (Alicante).: Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Obtido de <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/parasitologia/crypto.pdf>
- Santos, I. (2009, Dezembro). Contaminação dos produtos vegetais pela água. *Segurança e Qualidade Alimentar*, (7), 11–13.
- Sousa, C. P. (2006). Segurança alimentar e doenças veiculadas por alimentos: utilização do grupo coliforme como um dos indicadores de qualidade de alimentos. *Revista APS*, 9(1), 83–88.
- Tzipori, S., & Ward, H. (2002). Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. *Microbes and Infection*, 4(10), 1047–1058. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(02\)01629-5](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(02)01629-5)
- University of Oklahoma. Study Abroad Microbiology in Arezzo, Italy[(2016). *Yersinia pseudotuberculosis* infection - MicrobeWiki. Obtido 28 de Novembro de 2016, de https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Yersinia_pseudotuberculosis_infection

Valentin-Bon, I., Jacobson, A., Monday, S. R., & Feng, P. C. H. (2008). Microbiological Quality of Bagged Cut Spinach and Lettuce Mixes. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(4), 1240–1242. <https://doi.org/10.1128/AEM.02258-07>

Vilarta, R., Alessandra de Souza Cerri, Ana Claudia Alves Martins, Christiane de Vasconcelos Affonso, Dênis Marcelo Modeneze, & Efigênia Passarelli Mantovani. (2007). *Alimentação Saudável, Atividade Física e Qualidade de Vida*. Campinas: IPES Editorial.

World Health Organization. (2008). *Guidelines for drinking-water quality* (3.^a ed., Vol. 1). Geneva: WHO Library.